

# **Alterações cardiovasculares induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops leucurus***

**Gustavo Baptista Naumann**

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, abril de 2018

# **Alterações cardiovasculares induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops leucurus***

**Gustavo Baptista Naumann**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suely G. Figueiredo

Co-orientador: Dr.Eládio Flores Sanchez

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, abril de 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DO CANDIDATO**  
**AO TÍTULO DE DOUTOR PELO PPGCF/CCS/UFES**

**Número da matrícula do candidato: 2014140266**

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada "Alterações cardiovasculares induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops leucurus*", apresentada e defendida publicamente pelo aluno Gustavo Baptista Naumann, no dia 5 de abril de 2018, às 13h, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 5 de abril de 2018.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suely Gomes de Figueiredo  
Orientadora

Dr.<sup>a</sup> Márcia Helena Borges  
Membro externo

Prof. Dr.<sup>a</sup> Rita Gomes Wanderley Pires  
Membro externo

Prof. Dr.<sup>a</sup> Sonia Alves Gouvêa  
Membro interno

Prof. Dr.<sup>a</sup> Nazaré Souza Bissoli  
Membro interno

Este trabalho foi realizado majoritariamente no Laboratório de Química de Proteínas e no Laboratório de Hipertensão Experimental da Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, com apoio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES).

## **DEDICATÓRIA**

Esta tese é dedicada à minha família.

“Nobody said it was easy.”

(The Scientist, Cold Play)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por todos os dias me dar mais do que peço e muito mais do que mereço e por sempre me permitir estar cercado de pessoas maravilhosas.

Agradeço a meus pais, Paulo e Karla, pelo amor incondicional e por todos os valores e ensinamentos que sempre me proporcionaram. Tenho enorme gratidão pelo esforço que vocês fizeram para me proporcionarem a melhor educação.

Aos meus irmãos, Rafael e Tiago por me mostrarem a mais pura demonstração de amizade que existe.

A minha esposa Roberta, por tornar minha vida muito mais completa e divertida e por sempre estar ao meu lado me estimulando e me encorajando.

Aos queridos amigos do Laboratório de Química de Proteínas, em especial ao Thiago (Murção), pelos grandes ensinamentos e pelos 4 anos de trabalho e muita diversão.

Aos amigos da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Wender, Polyana, Helena, Fabrício, Natalie e muito outros pela enorme ajuda, principalmente na experimentação animal.

Aos amigos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG), em especial a meu co-orientador Dr. Eládio Oswaldo Flores Sanchez.

A todos os meus amigos e familiares por tornarem os meus momentos fora da universidade tão prazerosos.

Agradecimento especial a minha orientadora Suely Gomes de Figueiredo, por todos os ensinamentos e por estar sempre disponível. Nunca ouvi falar de uma orientadora mais dedicada.

## RESUMO

*Bothrops leucurus* (jararaca-do-rabo-branco) é a principal espécie causadora de acidentes ofídicos na região Nordeste do Brasil e norte do Espírito Santo. Diversos estudos têm investigado as características bioquímicas da peçonha dessa serpente, bem como seus efeitos locais. Entretanto, efeitos sistêmicos como os cardiovasculares têm sido pouco explorados. O objetivo do presente trabalho foi investigar as atividades cardiovasculares agudas induzidas pela peçonha de *B. leucurus* (BIV) "in vivo" e em "in vitro". Em ratos anestesiados foi demonstrado que BIV (10-100µg/kg), induz hipotensão imediata e transiente, a resposta máxima foi observada em 5 min e houve um retorno a valores basais em  $\approx$  20 minutos. Os animais não apresentaram alteração na frequência cardíaca. Os efeitos in vitro foram avaliados em anéis de artéria mesentérica pré-contráídos com fenilefrina utilizando um miógrafo de resistência. Foi demonstrado que BIV (1-20 µg/mL) causa vasodilatação dose dependente nestes vasos, atingindo a resposta máxima em  $\approx$  10 minutos, com recuperação progressiva após 15 minutos. Um menor relaxamento do vaso foi observado em vasos sem endotélio, demonstrando que além do músculo liso vascular o endotélio também participa desta resposta. O pré-tratamento dos animais e/ou dos vasos com inibidores de vias envolvidas nestas repostas - indometacina (inibidor da ciclooxigenase), L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase), heparina (inibidor indireto da trombina), atropina (antagonista muscarínico), PMSF (inibidor de serinoprotease) e EDTA (inibidor de metaloprotease) - mostrou que somente a indometacina foi capaz de reduzir a resposta cardiovascular induzida pela BIV (50 µg/kg). Este inibidor foi capaz de bloquear  $\approx$  45% e  $\approx$  77% das alterações nas pressões sistólica e diastólica e  $\approx$  30% do relaxamento vascular induzido pela BIV, sugerindo a participação dos metabólitos do ácido araquidônico nessas respostas. Um componente proteico que reproduz os efeitos cardiovasculares observados foi purificado por duas etapas cromatográficas (Troca iônica e Fase reversa). Análises por espectrometria de massas - MALDI-ToF e MALDI-MS - revelaram que a proteína com atividade cardiovascular apresenta massa molecular (MW) de 13.889,975 Da e identificaram uma sequência interna de 27 resíduos de aminoácidos. Essa MW corresponde à da fosfolipases bID-PLA2 já purificada da peçonha de *B. leucurus*, e a sequência identificada apresenta 100% de identidade com os resíduos 10 ao 36 -



cobertura de 22% dessa molécula. Estes dados permitem inferir que a proteína purificada é a bID-PLA2. Neste trabalho foi demonstrado que a peçonha da *B. leucurus* induz vaso relaxamento e consequentemente hipotensão imediata após o envenenamento, e parte destes efeitos são acarretados pelo aumento da liberação de prostanóides vasodilatadores pela atividade esterásica da bID-PLA2.

Palavras-chave: *Bothrops leucurus*, reatividade vascular, hipotensão, fosfolipase A2.

## ABSTRACT

*Bothrops leucurus* (white tail jararaca) is the main responsible for ophidian accidents in the northeastern region of Brazil and northern Espírito Santo. Several studies have evaluated the biochemical features of this snake's venom, as well as its local effects. However, systemic effects – in particular cardiovascular effects – remain rather poorly explored. In the present study, we sought to investigate the acute cardiovascular activities induced by *B. leucurus* venom (VB) *in vivo* and *in vitro*. In anaesthetized rats it was demonstrated that BIV (10-100 $\mu$ g/kg) induces immediate and transient hypotension, while maximum response was observed in 5 min and a return to baseline was observed in  $\approx$  20 minutes. No change in the heart rate of the animals was observed. *In vitro* effects were evaluated on pre-contracted mesenteric artery rings with phenylephrine, employing a resistance myograph. BIV (1-20  $\mu$ g/mL) has been shown to cause dose-dependent vasodilation in these vessels, reaching the maximum response in  $\approx$  10 minutes and progressively recovering after 15 minutes. Lower levels of relaxation were observed in vessels without endothelium, implying that, in addition to vascular smooth muscle, the endothelium participates in this response. Pretreatment of the animals and/or the vessels with inhibitors of pathways involved in these responses - L-NAME (nitric oxide synthase), heparin (thrombin inhibitor), atropine (muscarinic antagonist), PMSF (serinoprotease inhibitor) and EDTA (metalloprotease inhibitor) - revealed that only indomethacin was able to reduce the cardiovascular response induced by BIV (50  $\mu$ g / kg). This inhibitor was able to block the changes in systolic and diastolic pressures ( $\approx$  45% and  $\approx$  77%) and  $\approx$  30% of vascular relaxation induced by BIV. These data point to the participation of arachidonic acid metabolites in these responses. A protein component that reproduces the observed cardiovascular effects was purified through two chromatographic steps (ion exchange and reverse phase). Mass spectrometric analysis - MALDI-ToF and MALDI-MSD - revealed that the protein presenting cardiovascular activity had a MW of 13.889,975 Da, along with identifying an internal sequence of 27 amino acid residues. This MW corresponds to that of the bID-PLA2, already purified from the *B. leucurus* venom, with the identified sequence showing 100 % identity with residues 10 to 36 - 22% coverage. These data allow us to infer that the purified protein is bID-PLA2. In this study it was shown that *B. leucurus* venom induces vasorelaxation and, as a consequence,

immediate hypotension after the envenomation, with some of these effects being elicited by the increased release of vasodilator prostanoids by the esterase activity of bID-PLA2.

Key words: *Bothrops leucurus*, vascular reactivity, hypotension, phospholipase A2.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> APARATOS ESPECIALIZADOS DE INOCULAÇÃO DE PEÇONHAS .....	19
<b>FIGURA 2:</b> DISTRIBUIÇÃO DOS ACIDENTES OFÍDICOS NO BRASIL .....	21
<b>FIGURA 3:</b> DISTRIBUIÇÃO DE ALGUMAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>BOTHROPS</i> NO TERRITÓRIO NACIONAL .....	24
<b>FIGURA 4:</b> <i>BOTHROPS LEUCURUS</i> .....	25
<b>FIGURA 5:</b> NÚMERO DE TRABALHOS INDEXADOS NA BASE DE DADOS DIGITAL <i>PUBMED</i> , RELACIONADOS À PEÇONHAS DE SERPENTES DO GÊNERO <i>BOTHROPS</i> .....	26
<b>FIGURA 6:</b> ACIDENTE BOTRÓPICO .....	27
<b>FIGURA 7:</b> PRINCIPAIS COMPONENTES PROTEICOS DE PEÇONHAS BOTRÓPICAS .....	29
<b>FIGURA 8:</b> FATORES ENVOLVIDOS NO CHOQUE CARDIOVASCULAR APÓS ENVENENAMENTO BOTRÓPICO .....	32
<b>FIGURA 9:</b> VIA DO METABOLISMO DO ÁCIDO ARACDÔNICO .....	35
<b>FIGURA 10:</b> EFEITO DA INJEÇÃO DA PEÇONHA BRUTA DE <i>B. LEUCURUS</i> SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS ANESTESIADOS .....	56
<b>FIGURA 11:</b> CURVA DOSE-RESPOSTA DA PEÇONHA BRUTA DE <i>B. LEUCURUS</i> SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS ANESTESIADOS .....	59
<b>FIGURA 12:</b> EFEITOS NA PRESSÃO ARTERIAL DE DOSES SUBSEQUENTES <i>VERSUS</i> DOSE ÚNICA DA PEÇONHA DE <i>B. LEUCURUS</i> .....	61
<b>FIGURA 13:</b> ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS INDUZIDAS PELA PEÇONHA DE <i>B. LEUCURUS</i> .....	62
<b>FIGURA 14:</b> EFEITOS DA BIV NA REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS ISOLADOS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATOS .....	64
<b>FIGURA 15:</b> PARTICIPAÇÃO DO ENDOTÉLIO VASCULAR NA RESPOSTA À PEÇONHA DE <i>B. LEUCURUS</i> .....	65
<b>FIGURA 16:</b> ESTUDO DA VIA DE RELAXAMENTO VASCULAR .....	66
<b>FIGURA 17:</b> NEUTRALIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES <i>IN VIVO</i> PELO SORO ANTIBOTRÓPICO .....	68
<b>FIGURA 18:</b> NEUTRALIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES <i>IN VITRO</i> PELO SORO ANTIBOTRÓPICO .....	69
<b>FIGURA 19:</b> PRIMEIRA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DE <i>B. LEUCURUS</i> .....	71
<b>FIGURA 20:</b> PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FASE REVERSA DA FRAÇÃO 5 PROVENIENTE DA WCX-1 .....	73
<b>FIGURA 21:</b> ESPECTROS DE MASSA DAS FRAÇÕES BI-5-I E BI-5-II UTILIZANDO A METODOLOGIA DE MALDI-TOF .....	75
<b>FIGURA 22:</b> FRAGMENTAÇÃO E OBTENÇÃO DA SEQUENCIA PARCIAL DE AMINOÁCIDOS DE BI-5-I E BI-5-II .....	76

<b>FIGURA 23:</b> ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOACIDOS OBTIDAS .....	79
<b>FIGURA 24:</b> EFEITO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS NA REATIVIDADE VASCULAR.....	80
<b>FIGURA 25:</b> CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS VASCULARES .....	81
<b>FIGURA 26:</b> RESPOSTA VASODILATADORA INDUZIDA PELA BLD-PLA <sub>2</sub> .....	96

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> NOVA CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>BOTHROPS</i> SEGUNDO FENWICK (2009).	23
<b>TABELA 2:</b> MEDIDAS HEMODINÂMICAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA BLV .....	58
<b>TABELA 3:</b> CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	acetilcolina
ACN	acetonitrila
AMP <sub>c</sub>	adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
BID-PLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub> purificada da peçonha <i>Bothrops leucurus</i>
BIV	<i>Bothrops leucurus</i> venom (peçonha de <i>Bothrops leucurus</i> )
BPPs	peptídeos potencializadores de bradicinina
COX	ciclooxigenase
Da	Dalton
ECM	matriz extracelular
EDHF	fator hiperpolarizante dependente de endotélio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	erro padrão da média
FC	frequência cardíaca
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
INDO	indometacina
ISD	In Source Decay
L-NAME	N( <sup>ω</sup> )-nitro-arginina metil éster
Leuc-a	leucurolisina-a purificada da peçonha <i>Bothrops leucurus</i>
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
NO	óxido nítrico
NO	óxido nítrico sintase
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	prostaciclina
Phe	fenilefrina
PLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub>
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil

Rp-8-CPT-cAMPs	8-(4-Chlorophenylthio)adenosine-3',5'-cyclic Monophosphorothioate, Rp-isomer sodium salt
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SVMP	metaloprotease de peçonha de serpente
SVSP	serinoprotease de peçonha de serpente
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina
TFA	ácido trifluoroacético
ToF	Time of Flight



# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
<b>1.1 PEÇONHAS ANIMAIS.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 SERPENTES PEÇONHENTAS .....</b>	<b>20</b>
1.2.1 O gênero <i>Bothrops</i> .....	22
1.2.2 A espécie <i>Bothrops leucurus</i> .....	24
<b>1.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PRINCIPAIS EFEITOS DAS PEÇONHAS BOTRÓPICAS .....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.1 EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS PEÇONHAS BOTRÓPICAS .....</b>	<b>30</b>
<b>1.4 TERAPÊUTICA APÓS ENVENENAMENTOS .....</b>	<b>36</b>
2 JUSTIFICATIVA.....	39
3 OBJETIVO.....	41
<b>3.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>41</b>
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
<b>4.1 REAGENTES.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 OBTENÇÃO DA PEÇONHA DE BOTHROPS LEUCURUS E SORO ANTIBOTRÓPICO .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 ANIMAIS .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>45</b>
<b>4.5 ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DA PEÇONHA: ENSAIOS IN VIVO E IN VITRO .....</b>	<b>45</b>
4.5.1 Parâmetros hemodinâmicos .....	45
4.5.2 Estudo dos mecanismos envolvidos nas alterações hemodinâmicas induzidas pela peçonha de <i>Bothrops leucurus</i> .....	46
4.5.3 Reatividade vascular em anéis isolados de artéria mesentérica .....	47
4.5.4 Participação do endotélio vascular na resposta à peçonha de <i>Bothrops leucurus</i> .....	48
4.5.5 Estudo da via envolvida no relaxamento vascular.....	48
<b>4.6 NEUTRALIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES PELO SORO ANTIBOTRÓPICO .....</b>	<b>48</b>
4.6.1 Parâmetros hemodinâmicos .....	49
4.6.2 Reatividade vascular .....	49
<b>4.7 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO RESPONSÁVEL PELOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DA PEÇONHA DE BOTHROPS LEUCURUS.....</b>	<b>50</b>
4.7.1 Primeira etapa da purificação: Cromatografia de troca catiônica em coluna WCX-I.....	50
4.7.2 Segunda etapa da purificação: Cromatografia de fase reversa em coluna C18 .....	51
<b>4.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) .....</b>	<b>51</b>
<b>4.9 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES PROTEICOS PURIFICADO .....</b>	<b>52</b>
4.9.1 MALDI-ToF.....	52
4.9.2 MALDI-MS .....	53
4.9.3 Identificação dos peptídeos obtidos e alinhamento com sequência de moléculas homologas utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).....	54
<b>4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>54</b>
5 RESULTADOS .....	56
<b>5.1 ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DA PEÇONHA: ENSAIOS IN VIVO E IN VITRO .....</b>	<b>56</b>

5.1.2 Estudo dos mecanismos envolvidos nas alterações hemodinâmicas induzidas pela peçonha de <i>Bothrops leucurus</i> .....	60
5.1.3 Reatividade vascular em anéis isolados de artéria mesentérica .....	63
5.1.4 Participação do endotélio vascular na resposta à peçonha de <i>Bothrops leucurus</i> .....	65
5.1.5 Estudo da via envolvida no relaxamento vascular.....	66
<b>5.2 NEUTRALIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES PELO SORO ANTIBOTRÓPICO .....</b>	<b>67</b>
5.2.1 Neutralização dos efeitos cardiovasculares <i>in vivo</i> .....	67
5.2.2 Neutralização dos efeitos vasodilatadores <i>in vitro</i> .....	69
<b>5.3 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO RESPONSÁVEL PELOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DA PEÇONHA DE BOTHROPS LEUCURUS.....</b>	<b>70</b>
5.3.1 Primeira etapa da purificação: Cromatografia de troca catiônica em coluna WCX-I.....	70
5.3.2 Segunda etapa de purificação: Cromatografia de fase reversa em coluna C18 .....	72
<b>5.4 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-ToF E MALDI-MSD .....</b>	<b>74</b>
<b>5.5 ANÁLISE DE HOMOLOGIA SEQUENCIAL UTILIZANDO BANCO DE DADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>5.6 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DAS PROTEÍNAS OBTIDAS APÓS A PURIFICAÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
6.1 EFEITOS HEMODINÂMICOS <i>IN VIVO</i> .....	84
6.2 EFEITOS <i>IN VITRO</i> .....	87
6.3 SOROTERAPIA.....	91
6.4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPONENTE – TOXINA – RESPONSÁVEL PELOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DA PEÇONHA DE <i>B. LEUCURUS</i> . ....	92
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>99</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>101</b>

# ***Introdução***

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Peçonhas animais

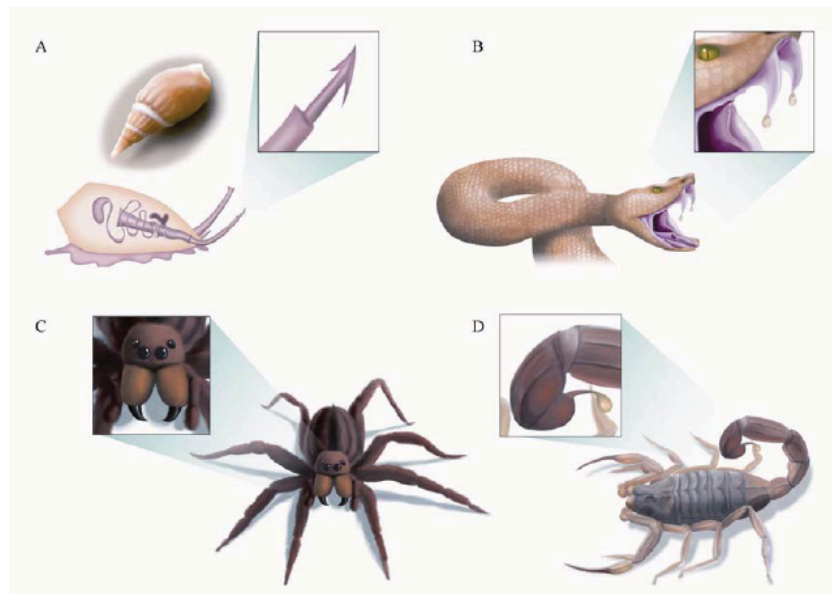
Os animais venenosos encontram-se amplamente difundidos nos diferentes ecossistemas, compreendendo mais de cem mil espécies catalogadas (Calvete et al., 2009). Em todos os níveis da escala filogenética, seus venenos têm evoluído como poderosos arsenais químicos, constituídos de substâncias que são utilizadas principalmente para captura de presas, digestão de alimentos e também defesa contra predadores (Russel, 1996).

Dentre os animais venenosos, aqueles que possuem estruturas especializadas como tecido glandular produtor/armazenador de veneno, bem como um aparato inoculador, são classificados como peçonhentos, e seu veneno é denominado peçonha. Estas, consistem em uma mistura complexa de substâncias de composição química diversificada e de amplo espectro de ação farmacológica. Dentre essas substâncias, encontram-se enzimas, neurotransmissores, ácidos nucleicos, sais inorgânicos, monoaminas, toxinas proteicas e não proteicas, além de outros compostos orgânicos ainda não identificados (Figueiredo, 1995; Mebs, 2002). A figura 1 mostra o aparato de inoculação da peçonha de alguns desses animais.

A complexidade e grande diversidade farmacológica dos componentes das peçonhas, entre diferentes espécies venenosas, e mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, resultam em variação na toxicidade e no modo de ação dessas (Glenn e Straight, 1978; Menezes et al., 2010).

Os estudos sobre peçonhas se iniciaram principalmente com o objetivo de compreender e combater o processo de envenenamento, e assim gerar alternativas terapêuticas para suas vítimas. Entretanto, a busca exclusiva de tratamento para o envenenamento foi aos poucos sendo compartilhada com a pesquisa de prospecção de moléculas bioativas com potencial biotecnológico presentes nessas misturas.

Vários fármacos usados atualmente foram desenvolvidos baseados na estrutura de componentes presentes em peçonhas. O primeiro exemplo de sucesso no desenvolvimento de uma droga a partir de uma toxina de peçonha animal ocorreu em 1975. O agente anti-hipertensivo captopril foi desenvolvido baseando-se na estrutura de um peptídeo potencializador de bradicinina (BPPs) isolado da peçonha da serpente *Bothrops jararaca* (Ferreira, 1965).



**Figura 1: Aparatos especializados de inoculação de peçonhas.** (A) caracol de cone, (B) serpente, (C) aranha e (D) escorpião. Extraído de Horta et al., 2016

Após o pioneirismo dos estudos com a peçonha de *B. jararaca* diversas substâncias com grande diversidade estrutural e farmacológica, como enzimas, peptídeos, proteínas, aminas biogênicas e outras, foram isoladas de peçonhas de animais (para revisão, consulte King 2011).

Devido a essa enorme diversidade, as peçonhas de animais representam fonte relevante para descoberta de novos componentes bioativos com potencial terapêutico e farmacológico, e também, como potencial instrumento de investigação de sistemas biológicos. O estudo de toxinas de venenos animais tem contribuído para a compreensão de alguns mecanismos moleculares de sistemas fisiológicos, p. ex. cardiovascular, neurológico e hemostático. Um exemplo clássico é a  $\omega$ -agatoxina isolada da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta*, que foi importante na identificação de subtipos de canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Adams et al., 1990).

## 1.2 Serpentes peçonhentas

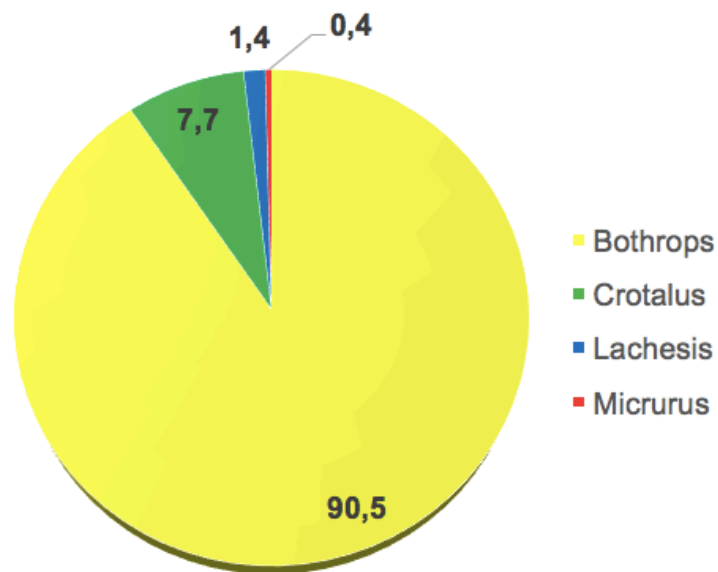
Aproximadamente 3000 espécies de serpentes estão descritas, e destas, apenas 650 espécies são tradicionalmente consideradas peçonhentas (Fry et al., 2009) e estão envolvidas em acidentes com humanos.

Um estudo da Organização Mundial da Saúde (OMS - 2007) estima que pelo menos 1.841.000 envenenamentos e 94.000 mortes ocorram todo ano no mundo decorrentes de acidentes ofídicos, principalmente em regiões tropicais. Desde 2009 a OMS categorizou o ofidismo como uma doença tropical negligenciada, uma vez que os números oficiais de acidentes com serpentes podem ser subestimados, transformando o ofidismo num problema de saúde ainda mais grave do que o descrito por esta organização (Global Snakebite Initiative, 2018).

O Brasil apresenta uma das mais ricas faunas de serpentes do planeta, onde se conhecem 366 espécies de serpentes reunidas em 10 diferentes famílias. Dessas, 55 espécies (~15%) são consideradas peçonhentas e pertencem a duas famílias: família Viperidae que abrange os gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (Surucucus); família Elapidae abrangendo os gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (corais) (Cardoso et al., 2003; Fenwick et al., 2009). Essas serpentes peçonhentas são distribuídas por todo território nacional e são comumente encontradas

em áreas rurais e nas periferias das grandes cidades, em ambientes úmidos como mata e áreas de cultivo, onde haja facilidade para proliferação de roedores (FUNASA, 2001).

Em 2014 foram notificados 171.567 acidentes por animais peçonhentos no Brasil, por meio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAM). Dentre esses, 27.261 foram acidentes ofídicos e 120 evoluíram para óbito, sendo essa a maior taxa de letalidade entre as espécies peçonhentas notificadas (Ministério da Saúde, 2016). Dentre os responsáveis por esses acidentes, o gênero *Bothrops* é o de maior relevância médica no país, sendo responsável por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos (fig. 2) (FUNASA, 2001).



**Figura 2: Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil.** Dentre os encontrados no Brasil, o gênero *Bothrops* apresenta maior incidência de acidentes com humanos (FUNASA, 2001).

### 1.2.1 O gênero Bothrops

A taxonomia de serpentes do gênero *Bothrops* (também chamado de gênero Botrópico), vem sendo amplamente discutida e avaliada (Fenwick et al., 2009). Após estudos filogenéticos e morfológicos, os autores propuseram uma nova classificação, onde as 26 espécies anteriormente incluídas no gênero *Bothrops*, atualmente estão divididas em cinco gêneros: *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerothis* (tabela 1).

Essas espécies são conhecidas popularmente como jararaca, urutu-cruzeiro, caixara e estão distribuídas desde o extremo norte até a região sul, de regiões litorâneas e ilhas até a parte mais continental do território nacional. Algumas dessas espécies apresentam maior importância epidemiológica devido a sua extensa distribuição geográfica, fazendo com que sejam as principais responsáveis pelos acidentes ofídicos no país. A espécie *B. atrox* é a principal responsável pelos acidentes na região Amazônica, a *B. jararaca* nas regiões sul e sudeste e *B. leucurus* principalmente na faixa litorânea do nordeste e no estado do Espírito Santo (fig. 3)(Melgarejo, 2003).



Tabela 1: Nova classificação do gênero *Bothrops* segundo Fenwick (2009).

GÊNERO	ESPÉCIES
<i>Bothropoides</i>	<i>B.alcatraz</i> ; <i>B.diporus</i> ; <i>B. erythromleas</i> ; <i>B.insularis</i> ; <i>B.jararaca</i> ; <i>B. lutzi</i> ; <i>B. marmoratus</i> ; <i>B. mattogrossensis</i> ; <i>B. neuwiedi</i> ; <i>B. pauloensis</i> e <i>B. pubescens</i>
<i>Bothrocophias</i>	<i>Bothrocophias hyoprora</i>
<i>Bothriopsis</i>	<i>Bothriopsis bilineata</i> e <i>B. taeniata</i>
<i>Rhinocerothis</i>	<i>Rhinocerothis alternatus</i> ; <i>R.fonsecai</i> ; <i>R.cotiara</i> e <i>R. itapetiningae</i>
<i>Bothrops</i>	<i>Bothrops atrox</i> ; <i>B. brazili</i> ; <i>B.jararacussu</i> ; <i>B. marajoensis</i> ; <i>B. moojeni</i> ; <i>B. muriciensis</i> ; <i>B. pirajai</i> e <b><i>B. leucurus</i>*</b>

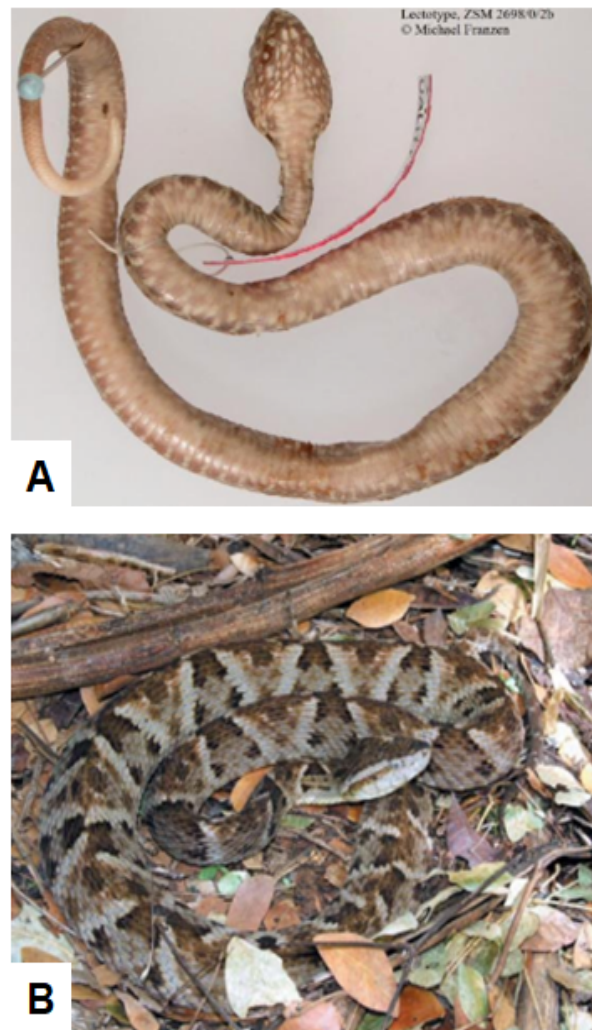
(\*) ***B.leucurus*** – Serpente cuja peçonha é objeto de estudo do presente trabalho.



**Figura 3: Distribuição de algumas das principais espécies do gênero *Bothrops* no território nacional.** Adaptado de Estevao-Costa et al., 2016.

### 1.2.2 A espécie *Bothrops leucurus*

A serpente *Bothrops leucurus* (fig. 4), cuja peçonha é objeto deste estudo, é conhecida popularmente como jararaca-do-rabo-branco em função da coloração esbranquiçada da porção distal de sua cauda quando filhote. Como as demais serpentes do gênero Botrópico, a *B. leucurus* apresenta cabeça triangular (*lancehead*, do inglês cabeça de lança), presença de fosseta loreal, cauda lisa e presa inoculadora tipo solenóglifa.

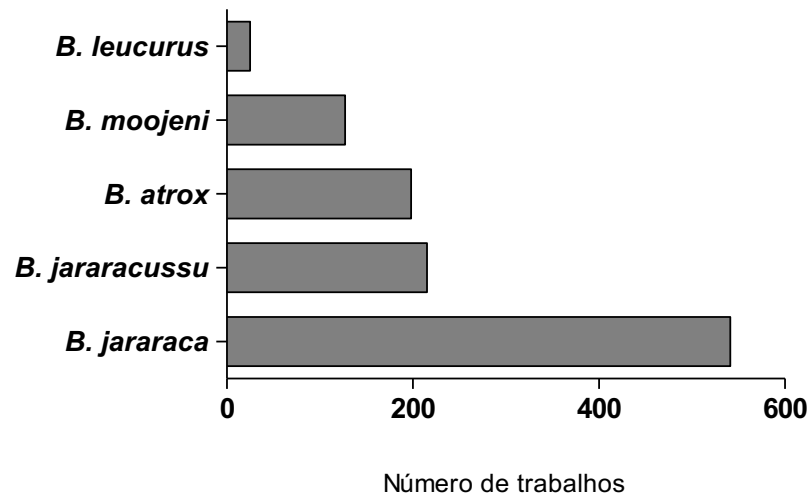


**Figura 4: *Bothrops leucurus*.** (A) imagem de espécime jovem (extraído de: <http://reptile-database.reptarium.cz/>) e (B) adulto (Lira da Silva, 2009).

Trata-se de uma espécie de porte médio, podendo atingir até 1,8 metro de comprimento e encontra-se distribuída principalmente nas áreas de floresta atlântica da região nordeste do Brasil, incluindo os estados da Bahia e do Ceará, se estendendo até o sudeste do Espírito Santo. A *B. leucurus* é considerada a principal serpente dessa

região, sendo a principal causadora de acidentes ofídicos em humanos (Lira da Silva et al., 2001; Sanchez et al., 1992).

Ao longo das últimas décadas, vários estudos têm explorado as peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. Uma pesquisa na base de dados do *PubMed*, revelou um maior número de estudos com as peçonhas *B. jararaca*, *B. jararacuçu* e *B. atrox*, enquanto que os dados sobre a peçonha de *B. leucurus* ainda são escassos quando comparada aos de outras espécies de *Bothrops* (fig. 5).

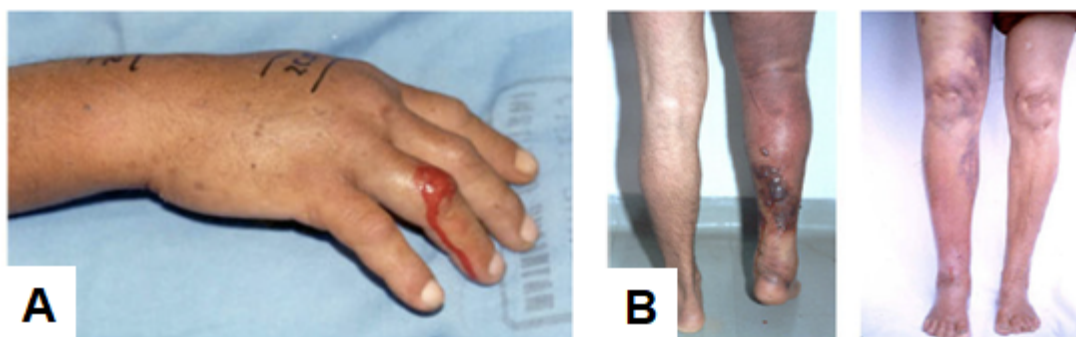


**Figura 5: Número de trabalhos indexados na base de dados digital *PubMed*, relacionados à peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. A espécie *B. leucurus* apresenta menor quantitativo de estudos dentre as principais espécies encontradas no Brasil. Pesquisa realizada em 10/12/2017.**

### 1.3 Composição química e principais efeitos das peçonhas botrópicas

As peçonhas botrópicas são misturas complexas de moléculas bioativas e - assim como outras peçonhas - são utilizadas para imobilizar e matar a presa, além de contribuir para a digestão da mesma. Sua composição possui grande diversidade mesmo dentro de uma mesma espécie, variando de acordo com a dieta, idade e sexo do animal.

O envenenamento botrópico induz diversos efeitos locais e sistêmicos (fig. 6). As alterações locais incluem dor, edema com formação de bolhas de conteúdo seroso, hemorragia local e necrose. Os efeitos sistêmicos são caracterizados por alterações na coagulação sanguínea, hemorragia sistêmica, insuficiência renal aguda (IRA) e choque cardiovascular. (França e Málaque, 2003).

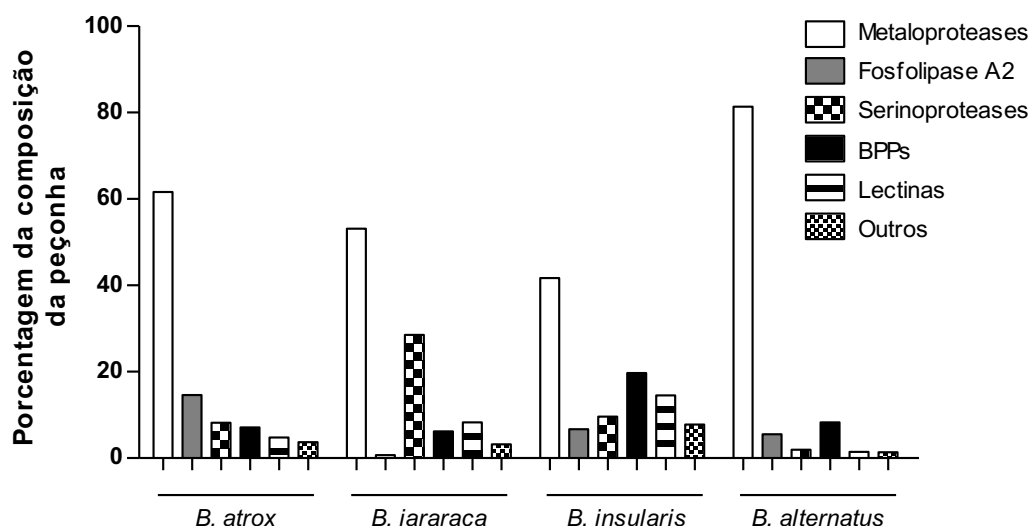


**Figura 6: Acidente botrópico.** (A) Alterações locais: Sangramento pelos orifícios onde ocorreu inoculação da presa, edema (inchaço e dor). (B) Problemas na coagulação sanguínea observada pela presença de bolhas de conteúdo variável (seroso, purulento e hemorrágico) e hematomas provocadas pela hemorragia. Extraído de Martim, 2014.

A maioria dos efeitos observados após o envenenamento é associada com toxinas proteicas da peçonha, as quais correspondem a aproximadamente 90% do seu

peso seco. Majoritariamente são encontradas enzimas (metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub> e L-aminoácido oxidase) e peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), desintegrinas e lectinas (Queiroz et al., 2008). Os componentes não proteicos consistem principalmente em carboidratos, nucleotídeos, aminas biogênicas, metais, lipídeos e aminoácidos livres. A figura 7 apresenta a porcentagem estimada das principais classes de moléculas para diferentes espécies.

As metaloproteases são as proteínas mais abundantes nessas peçonhas e estão relacionadas com os processos hemorrágicos, resposta inflamatória, inibição da agregação plaquetária, efeitos miotóxicos e cardiovasculares (Fox e Serrano, 2005; 2008). Outra classe de grande relevância são as serinoproteases, que são conhecidas principalmente por sua capacidade de afetar a hemostasia, processo que é mediado por enzimas conhecidas como *thrombin-like* (ação semelhante a trombina) e pelos ativadores de protrombina e do fator X, que afetam a coagulação sanguínea através do consumo dos fatores de coagulação (Serrano, 2013). As fosfolipases A<sub>2</sub>, uma das enzimas mais estudadas dessas peçonhas, atuam na hidrólise de ligação éster de fosfolipídios de membranas celulares, o que conduz a uma grande diversidade efeitos fisiológicos. De forma geral as atividades destas enzimas são associadas com atividades neuro- e miotóxica, edematogênica, pró-inflamatória, inibição de agregação plaquetária e resposta hipotensora destas peçonhas (Gutiérrez e Lomonte, 2013).



**Figura 7: Principais componentes proteicos de peçonhas botrópicas.** A figura mostra a representatividade das principais classes de moléculas presentes nas peçonhas botrópicas (Neiva et al., 2009; Cidade et al., 2006; Junqueira-de-Azevedo et al., 2002; Cardoso et al., 2010).

Tanto os efeitos locais como os sistêmicos do envenenamento - descritos anteriormente - podem ser associados à atividade dessas classes de proteínas, atuando individualmente ou em sinergia, ocasionando a perda da integridade das paredes vasculares, induzindo a vítima do envenenamento principalmente a: hemorragia local e sistêmica (Gutiérrez e Rucovado, 2000; Gutiérrez et al., 2005); distúrbios na coagulopatia através do consumo de fatores da coagulação (França e Maláque, 2003); aumento na resposta inflamatória (Texeira et al., 2009) e a liberação de uma variedade de mediadores endógenos como bradicinina, histamina e metabólitos do ácido araquidônico (Gapanhuk e Henriques, 1970; Olivo et al., 2007). Todos estes fatores, estão associados ao colapso cardiovascular.

### 1.3.1 Efeitos cardiovasculares das peçonhas botrópicas

O choque cardiovascular, consequência de severos envenenamentos ofídicos, é a principal causa de fatalidade relacionada aos acidentes com serpentes (Gutiérrez et al., 2009).

Em animais experimentais, a administração endovenosa de peçonhas botrópicas é capaz de induzir uma resposta hipotensora, caracterizada por uma queda abrupta na pressão arterial, atingindo sua resposta máxima 5 minutos após a injeção da peçonha. Após esse período, pode haver uma recuperação parcial dos níveis pressóricos ou uma queda gradual resultando em óbito (Lee e Lee, 1979). Esse efeito hipotensor já foi descrito para peçonhas de diversas espécies, como *Bothrops moojeni* (Andrade, 1996), *Crotalus atrox* (Russel et al., 1962), *Lachesis muta* (Granados-Zuniga e Aragón-Ortiz, 1998) e *Trimeresurus flavoviridis* (Kinjo et al., 1990).

Essa hipotensão e o choque cardiovascular provocados por essas peçonhas ofídicas, ocorrem principalmente por causa da liberação de substâncias vasoativas (vasodilatadores, vasoconstritores e moléculas pró-inflamatórias) que vão atuar, principalmente, sobre o sistema vascular (Lee e Lee, 1979; Hawgood, 1982; Aird, 2002). Em alguns casos, esses efeitos também podem estar relacionados com uma cardiotoxicidade direta (Santos et al., 1990; al Shammery et al., 1998; Gomes et al., 2001), ou também podem possuir uma origem central, por exemplo, por um bloqueio neuromuscular em decorrência da presença de neurotoxinas. (Ogay et al., 2005).

As alterações hemodinâmicas envolvidas na hipotensão podem variar entre as peçonhas, podendo envolver uma queda na resistência vascular periférica (mesentérica e ilíaca) e pulmonar, no débito cardíaco e no volume sistólico, com ou sem alteração na frequência cardíaca (Adams et al., 1981; Cevese et al., 1983; Tibballs et al., 1989).

Assim, os efeitos cardiovasculares das peçonhas botrópicas e de seus componentes, têm sido investigados na expectativa de esclarecer os principais mecanismos envolvidos nesses eventos (Dias, 2012; Evangelista et al., 2010; Rodrigues, 2016). O conhecimento desses mecanismos pode contribuir para estabelecimento de terapias complementares para o envenenamento ofídico.

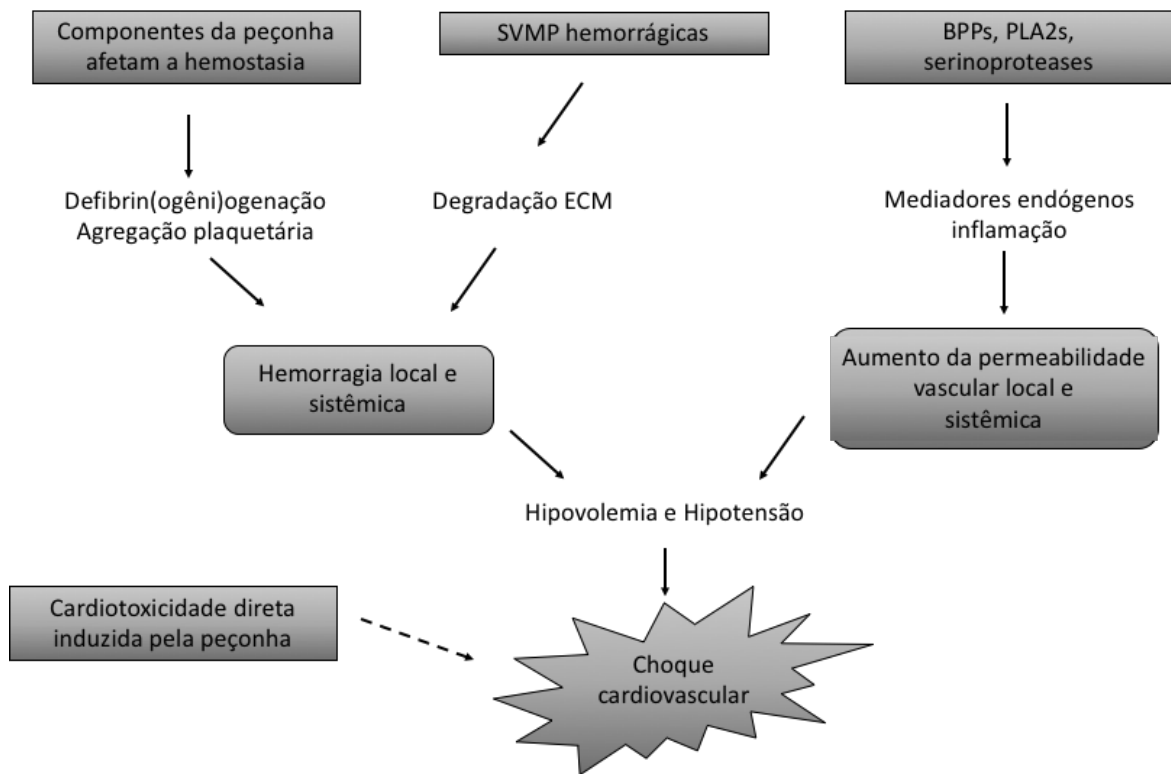


A hipotensão, característica marcante do envenenamento causado por peçonhas botrópicas, parece não ter relação com a cardiotoxicidade direta e sim com a diminuição da resistência vascular periférica. Como mencionado anteriormente, diversos componentes dessas peçonhas são conhecidos por induzirem redução da pressão arterial: metaloproteases, serinoproteases e peptídeos potencializadores de bradicinina fosfolipases A2 (Rocha e Silva et al., 1949; Evangelista et al., 2010; Guitiérrez et al., 2009).

A figura 8 apresenta os principais eventos que ensejam o choque cardiovascular após o envenenamento, bem como as classes de moléculas, encontradas em peçonhas botrópicas, que participam desse evento.

Possivelmente, um dos principais mecanismos responsáveis pelo choque cardiovascular é a perda maciça de sangue através das hemorragias locais e sistêmicas.

As metaloproteases de peçonha de serpente (SVMP,s, do inglês *Snake Venom Metaloproteases*), provavelmente são as principais responsáveis por esses efeitos. Essas SVMP são classificadas em diversos grupos baseados na composição de seus domínios (Fox e Serrano, 2005). A P-I SVMP apresenta somente o domínio metaloprotease, enquanto as P-II, P-III e P-IV apresentam domínios adicionais e que conferem atividades farmacológicas específicas, relacionadas principalmente a desestabilização da estrutura da matriz extracelular (Fox e Serrano, 2005).



**Figura 8: Fatores envolvidos no choque cardiovascular após envenenamento botrópico.**

Hemorragia local e sistêmica provocam uma perda massiva de sangue da circulação. Essa hemorragia é induzida por uma ação direta das SVMPs. Uma variedade de componentes dessas peçonhas, como as serinoproteases e fosfolipases A2 induzem a formação de mediadores inflamatórios endógenos que desencadeiam uma vasodilatação assim como um aumento local e sistêmico na permeabilidade vascular, contribuindo assim para hipovolemia e hipotensão. Além disso, peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) também induzem hipotensão. Também existem evidências de cardiotoxicidade direta induzida pela peçonha, contribuindo para o choque cardiovascular. Adaptado de Gutiérrez et al., 2009.

As peçonhas botrópicas apresentam principalmente as classes P-I e P-III na sua composição, sendo que as metaloproteases P-I parecem estar relacionadas somente à hemorragia local, devido a presença somente do domínio metaloprotease, enquanto as metaloproteases P-III, principalmente pela presença de seus domínios adicionais desintegrina-like e cisteína-like, conseguem se ligar a receptores da matriz extracelular

ou do endotélio celular longe do local da picada, podendo induzir hemorragia sistêmica (Gutiérrez et al., 2005).

Dessa forma, as metaloproteases são capazes de hidrolisar vários componentes da membrana basal, assim como as proteínas de membrana das células endoteliais, como as integrinas, envolvidas na adesão celular. Em uma revisão, Gutiérrez e colaboradores (2005) sugerem que possivelmente essa perturbação acaba por enfraquecer a parede do capilar, e como consequência, em algum ponto a integridade capilar é perdida e ocorre o extravasamento. Além disso, essas células endoteliais se tornam mais suscetíveis ao estresse de cisalhamento dependente do fluxo sanguíneo, o que pode contribuir ainda mais para a rompimento da parede capilar. Essa perda da integridade vascular pode levar a uma hemorragia sistêmica com consequente hipovolemia e hipotensão.

Essa hipovolemia pode se tornar ainda mais severa em decorrência da ação conjunta dessas proteases com componentes que induzem a hidrólise de fatores de coagulação e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Bernardoni et al., 2014).

Outra classe de proteases relacionadas aos efeitos cardiovasculares presente nas peçonhas botrópicas, são as serinoproteases de peçonha de serpente (SVSP,s, do inglês, *Snake Venom Serinoproteases*). Essas enzimas agem principalmente nos componentes da cascata de coagulação e nos sistemas fibrinolíticos e calicreína-cinina, causando desequilíbrio no sistema hemostático. As enzimas análogas a trombina (*thrombin-like*), atuam na degradação do fibrinogênio, podendo levar a uma depleção do fibrinogênio plasmático com consequente redução na coagulação sanguínea, ampliando assim o quadro hemorrágico induzido pelos envenenamentos, podendo evoluir para um choque hipovolêmico (Serrano, 2013). Ainda, outras SVSP estruturalmente semelhantes a calicreína, (*kallikrein-like*) possuem ação proteolítica sobre o cininogênio plasmático, promovendo a liberação do vasodilatador bradicinina e consequentemente hipotensão (Gapanhuk e Henriques, 1970).

Tanto a descoberta da bradicinina (Rocha e Silva et al., 1949) como dos peptídeos potencializadores de bradicinina - BPPs - (Ferreira e Rocha e Silva, 1965),

originadas de estudos de envenenamento pela serpente *Bothrops jararaca* desempenharam papel fundamental na compreensão da fisiopatologia cardiovascular.

No primeiro estudo, Rocha e Silva e colaboradores (1949), demonstraram que a peçonha de *B. jararaca* é capaz de liberar o vasodilatador bradicinina, através de uma atividade cininogenásica (análoga a calicreína) sobre o cininogênio circulante, induzindo hipotensão. Mais tarde, Ferreira e Rocha e Silva (1965), demonstraram que a peçonha de *B. jararaca* também contém outro fator de origem proteica capaz de potencializar os efeitos farmacológicos da bradicinina. Este fator posteriormente foi caracterizado e denominado peptídeo potencializador de bradicinina (Ferreira et al., 1970).

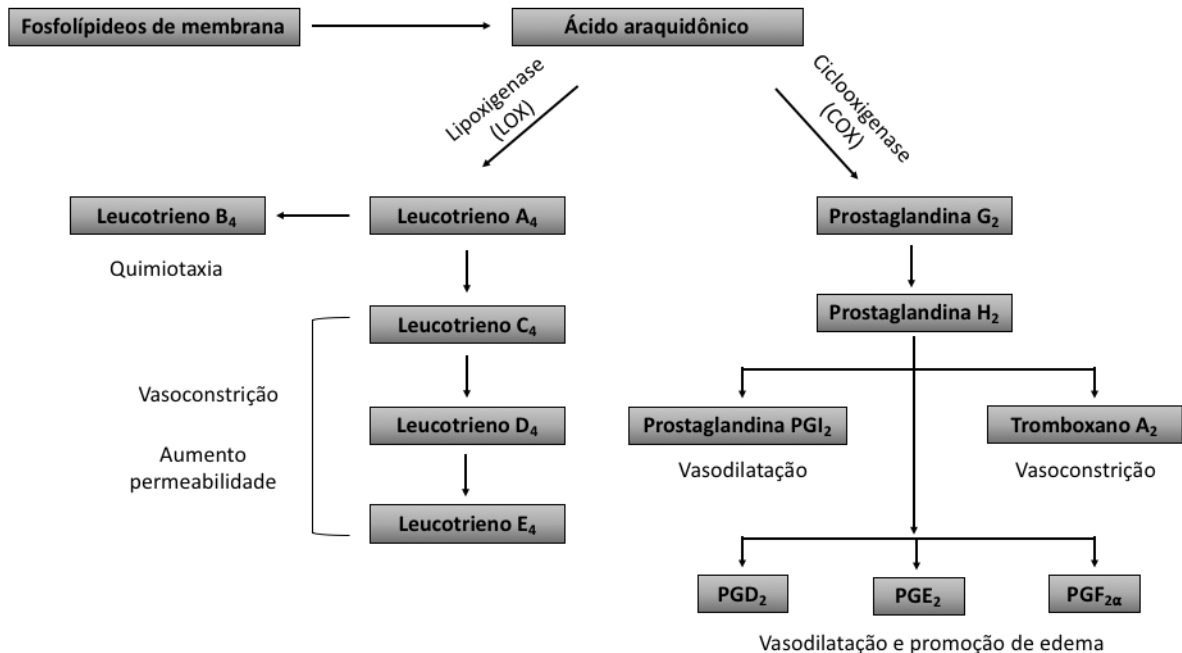
Ainda mais tarde, foi demonstrado que esses BPPs pertencem à família dos oligopeptídeos ricos em prolina, e suas atividades biológicas estão associados ao comprometimento de geração de angiotensina II e degradação da bradicinina (Hayashi e Camargo, 2005; Menin et al., 2008). Os BPPs atuam principalmente na inibição da enzima cininase II (enzima conversora de angiotensina ou simplesmente ECA), que é responsável tanto pela formação do vasoconstrictor angiotensina II, como pela degradação do vasodilatador bradicinina. Portanto, os BPP,s podem potencializar a hipotensão observada após o envenenamento, evitando a formação de angiotensina II e impedindo a degradação da bradicinina pela ECA (Camargo et al., 2012).

A outra classe de hidrolases que podem estar envolvidas nos eventos cardiovasculares induzidos por peçonhas animais são as PLA<sub>2</sub>s. Essas enzimas constituem uma superfamília de proteínas classificadas em diversos grupos e numerosos subgrupos, divididos de acordo com seu peso molecular, sequência de aminoácidos, requerimento de íon cálcio, número de pontes dissulfeto, entre outras características. (Dennis et al., 2011).

Essas moléculas são amplamente encontradas em venenos de serpentes, desempenhando diversas ações biológicas durante o envenenamento, sendo bastante conhecidas por suas atividades sobre membranas celulares e por sua capacidade de causar dano celular (Rosenberg, 1986). PLA<sub>2</sub> são enzimas que catalisam a hidrólise

específica da ligação 2-acil-éster de fosfolípidios, promovendo a liberação de ácidos graxos, p.ex. o ácido araquidônico e lisofosfolípidios.

Um dos principais efeitos induzidos pelas PLA<sub>2</sub>s presentes em peçonhas de serpente é sua capacidade de causar dano tecidual, principalmente em músculos esqueléticos (Gutiérrez e Lomonte, 1995). Contudo, estudos mostraram que essas, quando administradas i.m ou i.v, possuem muito pouco efeito a níveis de músculo cardíaco (Moreno e Gutiérrez, 1988). Por outro lado, o ácido araquidônico liberado pela ação das fosfolipases A<sub>2</sub> é metabolizado por duas vias para formação dos eicosanoides – os quais estão envolvidos em vários processos fisiológicos, como a vasodilatação (Fig. 9).



**Figura 9. Via de metabolismo do ácido araquidônico.** O ácido araquidônico, liberado pela degradação dos fosfolídeos de membrana, pode ser oxidado pela via da ciclooxygenase (COX) para formação das prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano ou pela via da lipoxigenase (LOX) para a formação dos leucotrienos. Esses mediadores químicos liberados exercem uma variedade de efeitos principalmente sobre o controle do tônus vascular, permeabilidade vascular e inflamação.

Em uma dessas vias, as prostaglandinas formadas, como a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) e prostaglandina ( $\text{PGE}_2$ ), promovem a vasodilatação através da ativação da adenilato ciclase via receptores acoplados às proteínas Gs, induzindo um aumento do AMPc, (Huang, 1984), conduzindo a hipotensão.

#### 1.4 Terapêutica após envenenamentos

No que diz respeito às estratégias terapêuticas dos acidentes com animais peçonhentos, além das intervenções farmacológicas nos sistemas e/ou mediadores envolvidos, a soroterapia é a mais eficaz e historicamente bem-sucedida.

Os princípios desse tratamento, hoje utilizado em todo mundo, são baseados nas pesquisas realizadas por Albert Calmette e Vital Brazil no início do século XX. Os soros antiofídicos são produzidos através da hiperimunização de animais, geralmente cavalos, com a peçonha de uma ou várias espécies de interesse. A partir do sangue desses animais, é obtido um soro rico em imunoglobulinas capazes de neutralizar suas principais toxinas.

No Brasil, os soros antiofídicos são fornecidos exclusivamente ao Ministério da Saúde pelos laboratórios produtores oficiais, Instituto Butantan (SP), Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) e Instituto Vital Brazil (RJ).

Experimentalmente já foi demonstrado que os soros antiofídicos são capazes de neutralizar grande parte dos efeitos provocados pelo envenenamento. Estevão-Costa e colaboradores (2016) demonstraram que o soro antibotrópico (FUNED-MG) foi eficiente em neutralizar as atividades hemorrágicas, proteolítica, coagulante e também a letalidade de cinco peçonhas botrópicas (*B. jararaca*, *B. leucurus*, *B. atrox*, *B. pictus* e *B. barnetti*). Essas informações, juntamente com outros estudos (Rojas et al, 2005; Furtado et al., 2010; Segura et al., 2010), mostram que apesar da eficácia dos soros antiofídicos estar relacionada às espécies de serpentes cujas peçonhas foram utilizadas

no processo de imunização, soros antibotrópicos produzidos na América Latina, demonstram alto grau de neutralização cruzada.

Apesar de a soroterapia ser o único método eficaz no tratamento do envenenamento ofídico, esta terapia induz efeitos adversos (p. ex. artralgia e adenomegalia), além de ser ineficaz na neutralização de efeitos tóxicos causados por componentes pouco imunogênicos, como as miotoxinas (Moura da Silva., 1990), pode acarretar choque anafilático, e também, possui baixa eficácia sobre os efeitos locais do envenenamento, o que pode levar a deficiências físicas permanentes (Srinivasa et al., 2014). Além disto, a produção do soro antibotrópico é cara e apresenta como aspecto ético, sofrimento excessivo aos animais utilizados na sua produção.

***Justificativa***



## 2 JUSTIFICATIVA

A peçonha do *B. leucurus* vem sendo estudada por alguns grupos de pesquisa e vários de seus componentes proteicos já foram caracterizados. Já foram descritas nesta peçonha: duas classes distintas de metaloproteases (P-I e P-III) com atividades hemorrágicas, coagulantes e edematogênica (Bello et al, 2006; Gremsky et al, 2007; Sanchez et al, 2009); uma enzima thrombin-like com atividade pró-coagulante (Magalhães et al, 2007); uma L-amino-acido-oxidase (LAAO), relacionada com citotoxicidade e inibição de agregação plaquetária (Naumann et al, 2011); uma lectina com atividade antibacteriana (Nunes et al, 2011) e duas fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) capazes de inibir a coagulação sanguínea e estimular o crescimento tumoral (Higushi, 2007).

Apesar de alguns estudos terem demonstrado a capacidade hipotensora de peçonhas botrópicas (Andrade, 1996; Pérez, 1997; Dias, 2012), e ainda relacionado esse efeito com atividades de proteases, fosfolipases A<sub>2</sub> e peptídeos presentes nestas peçonhas (Andrião-Escarso et al., 2002; Glusa et al, 1991; Murayama et al, 1997), ainda é necessário um estudo sistemático para compreender melhor as alterações cardiovasculares desencadeadas pelo envenenamento botrópico.

E ainda como já mencionado, o veneno de *B. leucurus*, espécie comumente encontrada no estado do Espírito Santo – Brasil, é o menos estudado entre as varias espécies do gênero Bothrops.

O presente estudo, objetiva - gerar conhecimentos - caracterizar e documentar pela primeira vez os efeitos cardiovasculares “*in vivo*” e “*in vitro*” da peçonha da serpente *B. leucurus*, visando descrever os mecanismos moleculares envolvidos como também identificar a(s) molécula responsável(is) por esses efeitos. O entendimento destas manifestações clínicas no envenenamento poderá contribuir para condução de terapias adicionais efetivas a soroterapia, já utilizada no tratamento dos acidentes botrópicos.

# ***Objetivos***

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi o de investigar os efeitos cardiovasculares *in vivo* e *in vitro* induzidos pela peçonha da serpente *Bothrops leucurus* e identificar o(s) componente(s) responsável(is) pelos efeitos observados.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos cardiovasculares induzidos pela peçonha bruta de *B. leucurus in vivo*:
  - Avaliar o efeito sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos anestesiados;
  - Investigar os mediadores químicos envolvidos na resposta cardiovascular através do uso de bloqueios farmacológicos;
- Investigar os efeitos cardiovasculares induzidos pela peçonha bruta de *B. leucurus in vitro*:
  - Avaliar o efeito na reatividade vascular em anéis isolados de artéria mesentérica;
  - Avaliar a participação do endotélio na resposta vascular;
  - Investigar as possíveis vias responsáveis pela resposta vascular através do uso de inibidores/bloqueadores específicos;
- Avaliar a capacidade do soro antiofídico pentavalente comercial em neutralizar as alterações cardiovasculares induzidas pela peçonha de *B. leucurus* tanto *in vivo* quanto *in vitro*;
- Identificar o(s) componente(s) - toxina(s) - da peçonha de *Bothrops leucurus* responsável pelos efeitos cardiovasculares;
- Isolar a(s) toxina(s) associada(s) às respostas observadas;
- Determinar suas propriedades bioquímicas das toxinas isoladas: Massa molecular e estrutura primária;

- Identificação da(s) toxina(s) purificada(s) pela busca de similaridade estrutural com toxinas botrópicas;
- Avaliar a capacidade vasodilatadora da(s) toxina(s) purificada(s) em vasos isolados;

# ***Material e Métodos***

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

Uretana, atropina, N( $\omega$ )-nitro-arginina metil éster (L-NAME), indometacina, heparina, fenilefrina (Phe), acetilcolina (Ach), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, MO, USA). Ácido trifluoroacético (TFA) e acetonitrila (ACN) foram adquiridos da Merck (USA). Todos os demais reagentes utilizados foram de qualidade analítica. As soluções foram preparadas em água purificada em sistema Milli-Q.

### 4.2 Obtenção da peçonha de *Bothrops leucurus* e soro antibotrópico

A peçonha de *B. leucurus* (BIV) foi extraída de espécimes capturadas no sul do estado da Bahia, mantidas no serpentário da Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte-MG), e após liofilização armazenada a -20°C até o momento do uso. O soro antibotrópico pentavalente utilizado, foi produzido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte-MG). A peçonha e o soro foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Química de Proteínas e Venenos Animais (LBVA-FUNED).

### 4.3 Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 3 meses de idade (250-300g), cedidos pelo Biotério de Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS-UFES). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas ( $22 \pm 2$  °C e 60 % respectivamente) sob ciclo claro/escuro (12:12 horas), com acesso livre a água e ração. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o recomendado pelas diretrizes da Sociedade Brasileira para a Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFES, 035/2015).

#### 4.4 Dosagem de proteínas

O conteúdo proteico da peçonha bruta e das frações obtidas nos processos cromatográficos foram determinadas pelo método de Lowry et al., (1951) utilizando soro albumina bovino como padrão.

#### 4.5 Atividade cardiovascular da peçonha: Ensaios *in vivo* e *in vitro*

##### 4.5.1 Parâmetros hemodinâmicos

Os efeitos cardiovasculares “*in vivo*” da peçonha bruta de *Bothrops leucurus* (BIV), relacionados à pressão sanguínea e frequência cardíaca, foram avaliados em ratos Wistar machos anestesiados com uretana (140 mg/100g i.p). Após anestesia, a artéria carótida e a veia jugular dos animais foram acessadas pela região cervical, e em seguida, cateteres de polietileno (PE-50, Clay-Adams), preenchidos com heparina (100 UI/ml), foram implantados em ambos os vasos. O acesso venoso foi utilizado para injeção das amostras de BIV ou de drogas de interesse no estudo, diluídas em solução salina (0,85% NaCl), enquanto que o acesso arterial foi utilizado para obtenção dos registros de pressão arterial e frequência cardíaca. A pressão arterial pulsátil foi registrada por um transdutor de pressão (Grass Instrument Div., Warnick, USA) e os sinais foram processados pelo sistema BIOPAC (MP100, Modelo PT300, Santa Barbara, USA). A frequência cardíaca foi obtida indiretamente e simultaneamente com as pressões sistólicas e diastólicas.

BIV foi administrado *in bolus* com doses crescentes de 10, 25, 50, 100 e 200 µg proteína/kg (N=5) ou em dose única de 50 µg proteína/kg (N=5) em um volume de 150 µL de solução salina. O tempo total de registro dos parâmetros hemodinâmicos foi de no máximo 120 minutos. Os resultados foram expressos como média ± EPM (erro padrão da média) e as doses utilizadas foram selecionadas por experimentos pilotos.

Durante todo o experimento, o animal respirou espontaneamente e o efeito do anestésico foi monitorado pela resposta ao estímulo doloroso e, quando necessário, doses adicionais de anestésico foram administradas.

Após o experimento, os animais que sobreviveram à administração da peçonha, foram submetidos a eutanásia com sobredose de anestésico.

#### *4.5.2 Estudo dos mecanismos envolvidos nas alterações hemodinâmicas induzidas pela peçonha de Bothrops leurocurus*

A fim de verificar a participação de alguns mediadores químicos nos efeitos de BIV na hemodinâmica, alguns inibidores e antagonistas para vias específicas foram utilizados. (1) Heparina (300 unidades/kg, i.v.) (Tibbals e Sutherland, 1992), foi utilizada para verificar o efeito da inibição da coagulação sanguínea. (2) Atropina (5 mg/kg, i.v.) (Barret, 1971), antagonista muscarínico não seletivo, para avaliar a participação dos receptores colinérgicos. (3) Indometacina (30mg/kg, i.v.) (Huang, 1984), inibidor da ciclooxigenase, para investigar a participação dos metabólitos do ácido araquidônico. (4) N ( $\omega$ )-nitro-arginina metil éster (L-NAME -10 mg/kg, i.v.) (Parkington, 2002), inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), para avaliar o envolvimento do óxido nítrico.

O experimento foi realizado como descrito anteriormente no item 4.5.1, entretanto, os antagonistas e inibidores foram administrados 15 minutos antes da injeção da peçonha (dose 50  $\mu$ g proteína/kg em 150  $\mu$ L de solução salina). Os resultados foram então comparados com o controle (solução isovolumétrica de solução salina) e com a mesma dose da peçonha isolada. Os experimentos foram realizados em 5 replicatas biológicas (N=5), e os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).



#### 4.5.3 Reatividade vascular em anéis isolados de artéria mesentérica

Para avaliar o efeito do BIV *in vitro* foram utilizados ensaios de reatividade vascular, usando um miógrafo de resistência (Modelo 620M; Danish Myo Tecnologia, Aarhus, Dinamarca).

Nesse experimento os animais foram sacrificados por decapitação sem utilização de anestésicos, a fim de evitar a interferência nos padrões de resposta (Hatano et al., 1989). Após o sacrifício, as artérias mesentéricas de terceira ordem foram identificadas, isoladas e dissecadas dos tecidos circundantes não vasculares. Os segmentos arteriais foram então seccionados em anéis de 2 mm e montados entre dois fios de tungstênio (40  $\mu$ m de diâmetro) dentro de câmaras do miógrafo de resistência, contendo solução de Krebs (composição em mM): NaCl (119), KCl (4.7),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4),  $\text{NaHCO}_3$  (14.9),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.17),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2.5) e glicose (5.5) a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica (5 %  $\text{CO}_2$  e 95 %  $\text{O}_2$ ), como descrito por Mulvany & Halpern (1977).

A circunferência interna foi normalizada para  $0,9 \cdot \text{IC}_{100}$ , onde os anéis foram gradualmente estirados até que o diâmetro interno correspondesse a uma pressão transmural de 100 mmHg.

A viabilidade e integridade do endotélio, foram avaliadas em resposta à administração de acetilcolina (ACh, 10  $\mu$ M) nos anéis previamente contraídos com fenilefrina (Phe, 3  $\mu$ M). Os anéis foram considerados íntegros, ou com endotélio intacto, quando o relaxamento vascular obtido em resposta à ACh foi > 50 %. Por outro lado, foram considerados sem endotélio, vasos cujo relaxamento à ACh foi < 10 %.

Doses da BIV (1, 5, 10 e 20  $\mu$ g/mL), selecionadas em experimentos pilotos, foram testadas separadamente em vasos pré-contraídos com 3  $\mu$ M de Phe (N=6).

Um anel pré-contraído com fenilefrina foi utilizado como controle de contração, sendo monitorado durante todo o período experimental. A porcentagem de relaxamento vascular foi determinada usando o sistema de aquisição de dados LabChart 8 (AD Instruments Pty Ltd, New South Wales, Austrália) e expressa como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).

#### *4.5.4 Participação do endotélio vascular na resposta à peçonha de *Bothrops leucurus**

A participação do endotélio na resposta vascular provocada pela BIV também foi investigada. Para isso o endotélio vascular foi removido mecanicamente, sendo considerados sem endotélio, vasos cujo relaxamento à ACh - após contração com Phe - foi < 10 %.

A reatividade vascular foi avaliada de acordo com protocolo descrito acima no item 4.5.3, usando a dose de peçonha de 10 µg/mL. A resposta vascular foi comparada à resposta induzida por essa mesma dose em um vaso íntegro (> 50 % de endotélio). A porcentagem de relaxamento vascular foi determinada e expressa como média ± EPM (N=5).

#### *4.5.5 Estudo da via envolvida no relaxamento vascular*

Para verificar a participação do óxido nítrico e dos metabólitos do ácido araquidônico na reatividade vascular, os anéis de artéria mesentérica íntegros foram pré-incubados com L-NAME (0,2 mM) (Crachi, 1999) e indometacina (10 µM) (Crachi, 1999) respectivamente, por 30 minutos antes da administração de BIV (10 µg/mL). Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF - 1mM) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - 2mM), - concentrações médias efetivas de inibição - foram pré-incubados a 37°C por 5 min antes da administração da BIV (10 µg/mL), para verificar o envolvimento das proteases (serinoproteases e metaloproteases - intrínsecas da peçonha), na resposta vascular observada. A reatividade vascular foi avaliada de acordo com protocolo descrito acima em 4.5.3. A porcentagem de relaxamento vascular foi determinada e expressa como média ± EPM (N=5-9).

### **4.6 Neutralização dos efeitos cardiovasculares pelo soro antibotrópico**

Avaliações de atividade cardiovascular *in vivo* e *in vitro*, também foram conduzidos para avaliar o potencial do soro antibotrópico em neutralizar os efeitos

observados para peçonha de *B. leucurus*. Os procedimentos para administração e monitoramento dos parâmetros hemodinâmicos e vasculares foram realizados conforme descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.3.

#### *4.6.1 Parâmetros hemodinâmicos*

Para avaliação do efeito do soro sobre as alterações hemodinâmicas induzidas pela BIV, foi utilizado o soro antibotrópico pentavalente (FUNED) de acordo com a relação indicada pelo fabricante: 1mL de soro para cada 5mg de peçonha de referência.

Cinquenta microgramas da peçonha/kg animal, foram pré-incubados com 10  $\mu$ L de soro antibotrópico em solução salina (volume final de 150  $\mu$ L) por 5 min a 37°C, e a mistura foi imediatamente administrada em ratos anestesiados (N = 5).

Separadamente, BIV (50  $\mu$ g/ kg) dissolvida em 150  $\mu$ L de solução salina, foi submetida às mesmas condições (37 °C por 5 min) e utilizada como controle positivo (N=5). Injeção isovolumétrica de solução salina foi utilizada como controle negativo. Os registros hemodinâmicos foram adquiridos durante 40 minutos e os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM

#### *4.6.2 Reatividade vascular*

Com o intuito de verificar a possível neutralização de alterações vasculares induzidos pela peçonha, o efeito de doses crescentes de soro antibotrópico foi avaliado sobre a resposta vascular induzido pela BIV.

Nesse ensaio, doses (10, 20, 30 e 40  $\mu$ L/mL do soro antibotrópico) foram pré-incubadas com uma dose única de BIV (10  $\mu$ L/mL) (N=5), a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, essas foram administradas em vasos isolados e os parâmetros vasculares foram monitorados conforme descrito no item 4.5.3. O efeito protetor foi calculado pela porcentagem de inibição - média  $\pm$  EPM (N=5) - do vasorelaxamento induzido pela mesma dose da BIV.

#### **4.7 Purificação da fração responsável pelos efeitos cardiovasculares da peçonha de *Bothrops leucurus***

Com o objetivo de identificar/purificar a(s) proteína(s) – toxina(s) – envolvidas nos efeitos cardiovasculares produzidos pela BIV, a peçonha bruta foi fracionada por etapas cromatográficas em sistema de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, do inglês **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography). O processo de fracionamento foi acompanhado pelo monitoramento da atividade das frações purificados na reatividade vascular em anéis isolados de artéria mesentérica conforme descrito no item 4.5.3.

##### *4.7.1 Primeira etapa da purificação: Cromatografia de troca catiônica em coluna WCX-1*

Cerca de 5 mg de peçonha bruta de *Bothrops leucurus* foram solubilizadas em 500 µL de tampão fosfato de sódio, 20 mM, pH 7,4 (eluente A) e filtrados em membranas Millex-HV (PVDF) 0,45 µm (Millipore). A peçonha filtrada foi dividida em 5 alíquotas (1 mg cada) e em seguida, aplicada em uma coluna de troca catiônica - Shim-pack WCX-1, Shimadzu (Kyoto, Japan) (4.0 mm de diâmetro X 5 cm de altura) - previamente equilibrada com o eluente A, em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-Shimadzu).

O material aplicado foi eluído utilizando tampão 20 mM fosfato de sódio, 1M NaCl, pH 7,4 (Eluente B) em 5 etapas isocráticas, a um fluxo constante de 0,5 ml/min. A cromatografia ocorreu conforme as seguintes etapas: 1ª etapa, 8 minutos em eluente A; 2ª etapa, 8-16 min, 15% eluente B; 3ª etapa, 16-24 min, 30% eluente B; 4ª etapa, 24-32 min, 50% eluente B; 5ª etapa, 32-45 min, 100% eluente B. A eluição das proteínas foi monitorada pela absorbância a 218/280 nm e as frações foram coletadas manualmente e mantidas em banho de gelo.

O material coletado das 5 cromatografias foi agrupado, dialisado contra água destilada por 24h a 4°C, liofilizado e armazenado até análises posteriores. As frações obtidas tiveram seu conteúdo proteico e atividade determinados de acordo com os itens 4.4 e 4.5.3.

#### *4.7.2 Segunda etapa da purificação: Cromatografia de fase reversa em coluna C18*

A fração com atividade cardiovascular obtida na primeira etapa de purificação, foi submetida à uma cromatografia de fase reversa. O procedimento foi realizado em sistema HPLC (Shimadzu) utilizando uma coluna Jupiter C18 300A, Phenomenex (EUA) (4.6 mm de diâmetro X 25 cm de altura). Aproximadamente 500 µg da fração com atividade cardiovascular, foi solubilizada em 2 mL de solução H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% v/v (eluente A) e aplicada à coluna C18 previamente equilibrada com o eluente A.

A eluição da amostra ocorreu em fluxo constante de 0,5 mL/min utilizando um gradiente linear de acetonitrila (ACN/TFA 0,1% v/v) 0-100% (eluente B), e a eluição das proteínas foi monitorada pela absorbância a 218/280 nm. Após a coleta manual das frações, estas foram liofilizadas e o conteúdo proteico estimado pela leitura da absorbância em 280 nm.

### **4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A homogeneidade e massa molecular das frações obtidas na cromatografia de troca iônica foi avaliada por SDS-PAGE.

A eletroforese foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970), utilizando um sistema de eletroforese com placas de 10 cm de comprimento por 8,2 cm de largura.

Os géis de separação (gradiente 7,5-15%) foram preparados a partir de uma solução de acrilamida-bis-acrilamida em água (29,2: 0,8%), contendo 0,1% SDS p/v, 0,1% persulfato de amônio p/v, 0,1 % de temed v/v e 0,375M Tris-HCL pH 8.8. O gel de concentração foi preparado a 4% a partir da mesma solução de acrilamida-

bisacrilamida, contendo Tris HCL 0,0625M pH 6,8 e as mesmas proporções de SDS, temed, e persulfato de amônio do gel de separação.

As amostras ( $\approx 10 \mu\text{g}$  de cada) foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 contendo 45 SDS p/v, 20% glicerol p/v e 1% azul de bromofenol. Essas soluções foram mantidas por 5 minutos a  $100^\circ\text{C}$  e aplicadas no gel.

A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente (20 mA por 15 min e posteriormente 30 mA até o final da corrida). O tampão de corrida utilizado foi Tris-HCl 0,025M, glicina 0,2M, 0,1% SDS, pH 8,3.

Após a corrida, as proteínas foram coradas por 30 minutos em solução 0,25% de azul de coomassie (R-250) em metanol: ácido acético: água (5: 1: 5) e o gel, descorado utilizando solução metanol: ácido acético: água (1: 2: 19). Como padrão de peso molecular, foi utilizado “*Broad Range SDS-PAGE standard*” (Bio-rad) composto por miosina (200 kDa), beta galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina soro bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrease carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

#### 4.9 Caracterização química dos componentes proteicos purificado

Os componentes proteicos de interesse, provenientes da última etapa de purificação (cromatografia de fase reversa), foram caracterizados quanto a massa molecular e a estrutura primária por espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF (do inglês, **Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight**) e MALDI-MSD (**Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – In Source Decay**).

##### 4.9.1 MALDI-ToF

Para aquisição dos espectros de massa, alíquotas de  $0,5 \mu\text{L}$  ( $\approx 5 \mu\text{g}$ ) de cada amostra foram aplicadas em placa Anchorship 600 (Bruker Daltonics). Logo após,  $0,5 \mu\text{L}$  da solução saturada da matriz de ácido sinapínico – SA - ( $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  em 60%

H<sub>2</sub>O/TFA/40% ACN) foi misturada às amostras para sua incorporação e posterior cristalização à temperatura ambiente.

Os espectros foram adquiridos utilizando o software Flex Control e analisados manualmente utilizando o software Flex Analysis, em um espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics), sendo operado em modo positivo/refletor.

A calibração externa foi realizada utilizando a mistura de proteínas Protein Standard II (Bruker), a qual continha: Tripsinogênio [M+H<sup>+</sup>] 23982 Da; Proteína A [M+H<sup>+</sup>] 44613 Da e albumina bovino [M+H<sup>+</sup>] 66431 Da.

#### 4.9.2 MALDI-MSD

O sequenciamento de aminoácidos das amostras foi realizado pelo Método de MALDI-MSD, sem necessidade de fragmentação química ou enzimática. As proteínas intactas (0,5 µL contendo  $\approx$  10 µg) foram aplicadas em placa Anchorship 600 (Bruker Daltonics) e misturadas com 0,5 µL da solução saturada de 1,5 – Diaminonaphthalene – 1,5 Dan – (20 µg/µL em 50% H<sub>2</sub>O/TFA/ 50% ACN) para incorporação e posterior cristalização à temperatura ambiente. Essas proteínas foram então ionizadas e fragmentadas usando laser na faixa de 40 a 50%, e esses íons foram detectados por ToF.

A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando o software Flex Control e o software Flex Analysis, usando o método RPSD em um espectrômetro de massas Autoflex III (Bruker Daltonics), operado em modo positivo.

A calibração externa foi obtida por fragmentação da proteína soro albumina bovina. As análises de espectrometria de massas foram realizadas com a colaboração “técnico-científica” da Dra. Márcia Helena Borges, do Laboratório de Proteômica e Aracnídeos da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG.

#### *4.9.3 Identificação dos peptídeos obtidos e alinhamento com sequência de moléculas homologas utilizando BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool)*

Após processamento, as sequências de aminoácidos obtidas foram submetidas ao banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot, utilizando o programa BLAST (algoritmo protein-protein BLAST), do NCBI (**N**ational **C**enter for **B**iotecnology **I**nformation) para identificação dessas proteínas.

Essas sequências foram também submetidas a alinhamento múltiplo com outras sequências de moléculas homólogas depositadas nesse banco de dados. O Alinhamento dessas sequências foi realizado pelo programa COBALT (**C**onstraint-**B**ased **A**lignment **T**ool) do NCBI.

#### **4.10 Análise Estatística**

Os dados apresentados nesse trabalho, são expressos como média  $\pm$  EPM. As diferenças entre as médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA) de uma via ou Teste t não pareado. Quando a ANOVA revelou diferença significativa, foi seguida de teste *post hoc* de Turkey. O valor de  $p < 0,05$  foi usado para indicar diferença significativa entre os grupos.



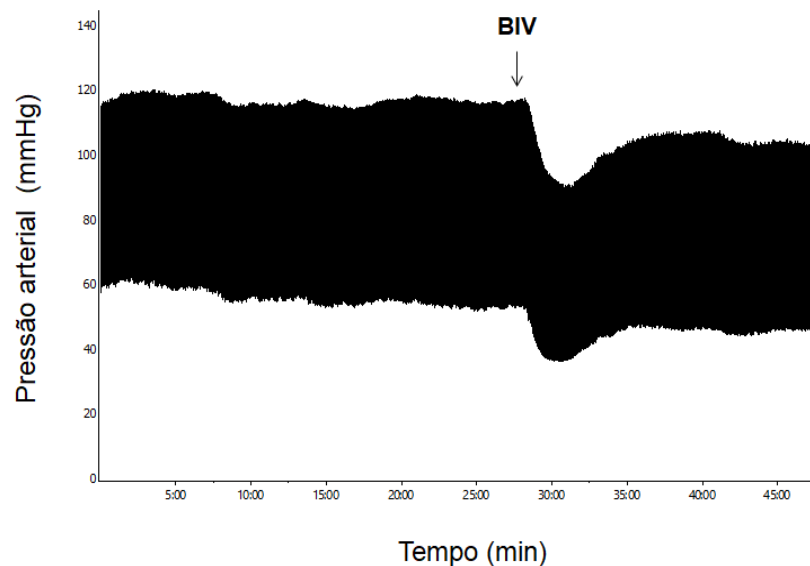
# ***Resultados***

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade cardiovascular da peçonha: Ensaios *in vivo* e *in vitro*

#### 5.1.1 Parâmetros hemodinâmicos

Os efeitos cardiovasculares - nos parâmetros hemodinâmicos - provocados pela peçonha bruta de *Bothrops leucurus* (BIV) foram avaliados *in vivo* através de injeção da BIV *in bolus* em ratos anestesiados. Ensaios preliminares foram realizados para definir doses subletais da peçonha, e a figura 9 apresenta um registro típico de uma medida hemodinâmica numa dose subletal.



**Figura 10: Efeito da injeção da peçonha bruta de *B. leucurus* sobre a pressão arterial de ratos anestesiados.** A figura apresenta o registro típico da pressão arterial após a injeção de uma dose subletal da peçonha (BIV), evidenciando uma redução imediata e transiente, com subsequente restauração dos níveis pressóricos próximos aos valores basais.

Em doses subletais, a BIV foi capaz de induzir alterações na pressão arterial (sistólica e diastólica), e essas alterações foram imediatas e transientes. A restauração dos valores pressóricos, próximos aos basais, foi após 20 minutos da injeção da peçonha.

Uma curva dose-resposta foi construída para verificar as alterações nos parâmetros hemodinâmicos induzidos por diferentes doses da peçonha. Para isto, foram administradas doses subsequentes de BIV: 10, 25, 50, 100 e 200 µg/kg. Como mostra a figura 11, a peçonha de *B. leucurus* é capaz de induzir alterações na pressão arterial de maneira dose-dependente.

As doses de 10, 25, 50, 100 e 200 µg BIV/kg reduziram a pressão sistólica em 0,5%, 3,8%, 4,6%, 8,3% e 18,8% e a pressão diastólica em 9%, 22,5%, 29,8%, 42,8 e 52,5% respectivamente (figura 11). A tabela 2 apresenta os dados da pressão arterial para as doses da BIV administradas.

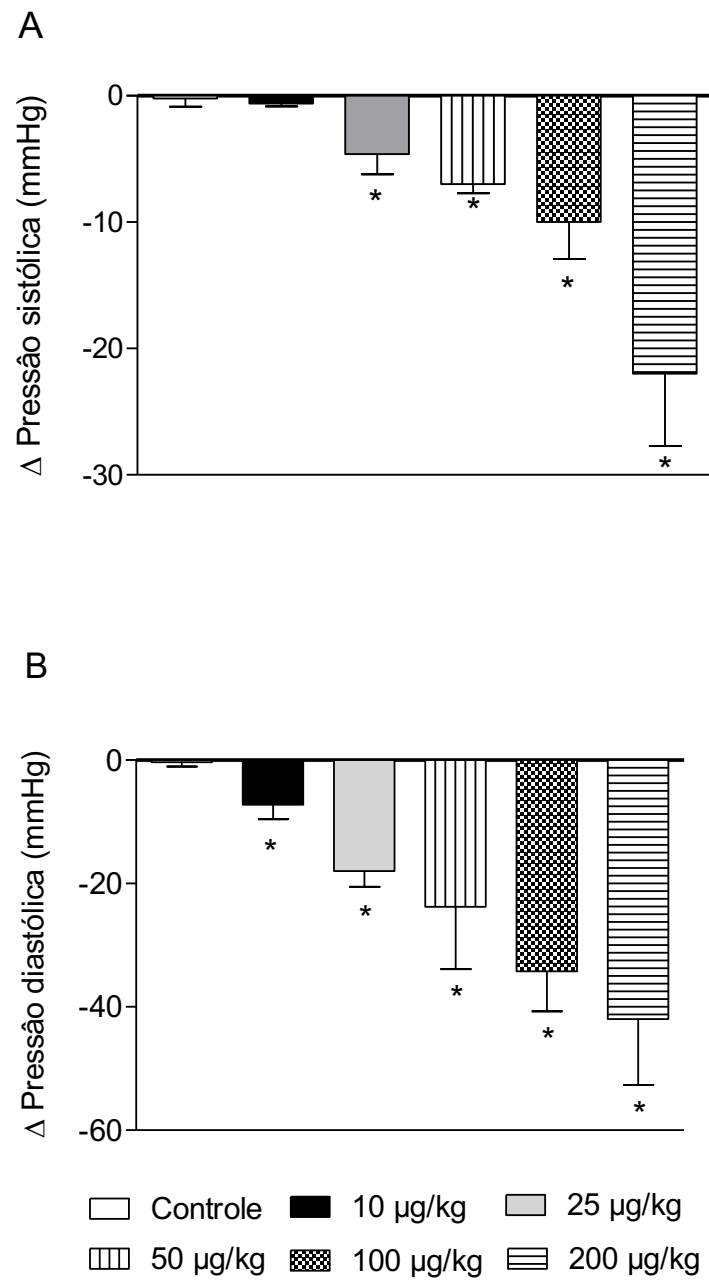
As respostas foram observadas aproximadamente 1 minuto após a administração da peçonha e os efeitos se mantiveram por 2,5-20 minutos, com exceção da maior dose (200 µg/kg), a qual foi letal para alguns animais após poucos minutos.

As doses testadas não afetaram significativamente a frequência cardíaca (FC) (dados não mostrados). Neste caso, as medidas da FC foram realizadas imediatamente antes da injeção da peçonha e novamente quando a resposta hipotensora atingiu seu máximo.

Animais injetados com solução salina (controle) não apresentaram nenhuma alteração significativa nos parâmetros avaliados.

**Tabela 2: Medidas hemodinâmicas após a administração da BIV.**

BIV	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	% redução PAS	% redução PAD
Basal (salina)	120±4,5	80±2,5	-	-
10 µg/kg	119,4±1,8	72,8±2,4	0,5	9
25 µg/kg	115,4 ±1,6	62,0±2,6	3,8	22,5
50 µg/kg	114,4 ±1,5	56,2±4,5	4,6	29,8
100µg/kg	110,0 ±2,2	45,8±2,9	8,3	42,8
200 µg/kg	98,0 ±4,5	38,0±4,8	18,8	52,5



**Figura 11: Curva dose-resposta da peçonha bruta de *B. leucurus* sobre a pressão arterial de ratos anestesiados.** A figura apresenta os dados da redução das pressões sistólica (A) e diastólica (B) de maneira dose-dependente ( $\mu\text{g}$  de proteína da peçonha por quilograma). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. As diferenças foram consideradas quando  $*p < 0,05$  em comparação ao grupo controle. N = 5.

### 5.1.2 Estudo dos mecanismos envolvidos nas alterações hemodinâmicas induzidas pela peçonha de *Bothrops leucurus*

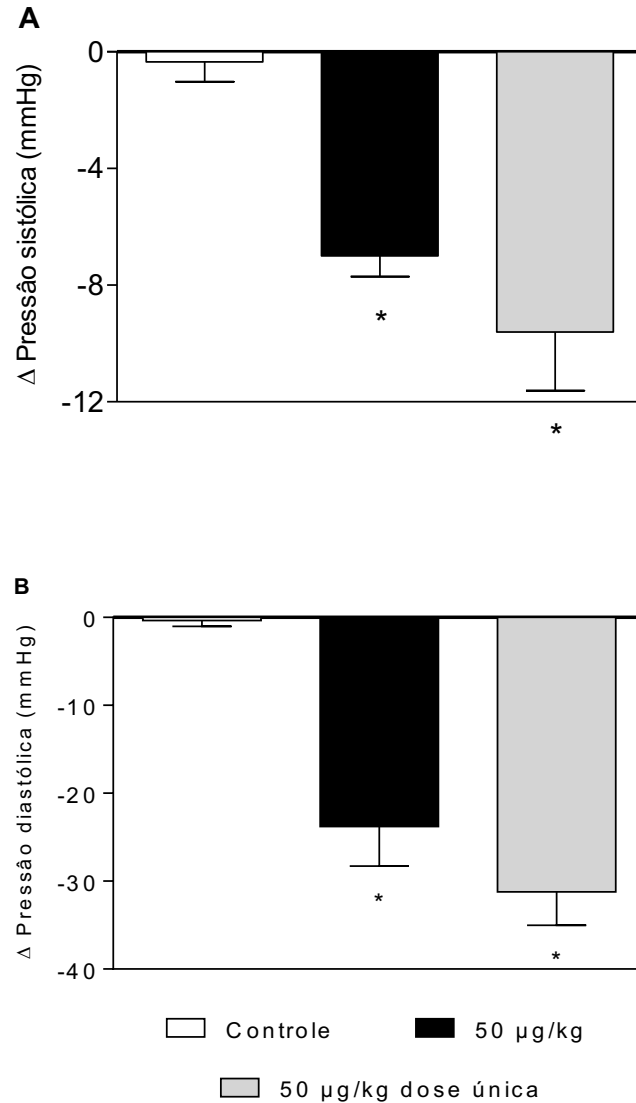
Com o objetivo de investigar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta cardiovascular induzida pela peçonha *Bothrops leucurus* (BIV), foram utilizados inibidores e antagonistas de via específicas relacionadas a regulação de parâmetros hemodinâmicos. Para essa análise, foi selecionada a dose de 50 µg/kg da BIV, a qual foi capaz de induzir resposta hipotensora significativa. Interessantemente, foi observado um efeito hipotensor mais significativo quando o animal recebeu 50 µg/kg em dose única (fig. 12).

A redução das pressões sistólica e diastólica (em mmHg) nos animais que receberam a dose única foi de  $120 \pm 4,5$  para  $110,4 \pm 2,0$  e  $80 \pm 2,5$  para  $48,8 \pm 3,8$ , respectivamente (fig. 12). Nos animais já desafiados com doses menores (10 e 25 µg/kg de BIV), as alterações após receber a dose de 50 µg/kg foram  $120 \pm 4,5$  para  $114,4 \pm 2,5$  mmHg (pressão sistólica) e  $80 \pm 2,5$  para  $56,2 \pm 4,5$  mmHg (pressão diastólica). A queda na pressão sistólica e diastólica foi 66% e 33% (respectivamente) maior quando a peçonha foi administrada em dose única. Não foram observadas alterações significativas na frequência cardíaca quando a peçonha foi administrada em dose única *versus* dose cumulativa.

A figura 13, apresenta os dados do efeito hemodinâmico da dose única (50 µg/kg da BIV) em animais previamente tratados com inibidores e antagonistas específicos.

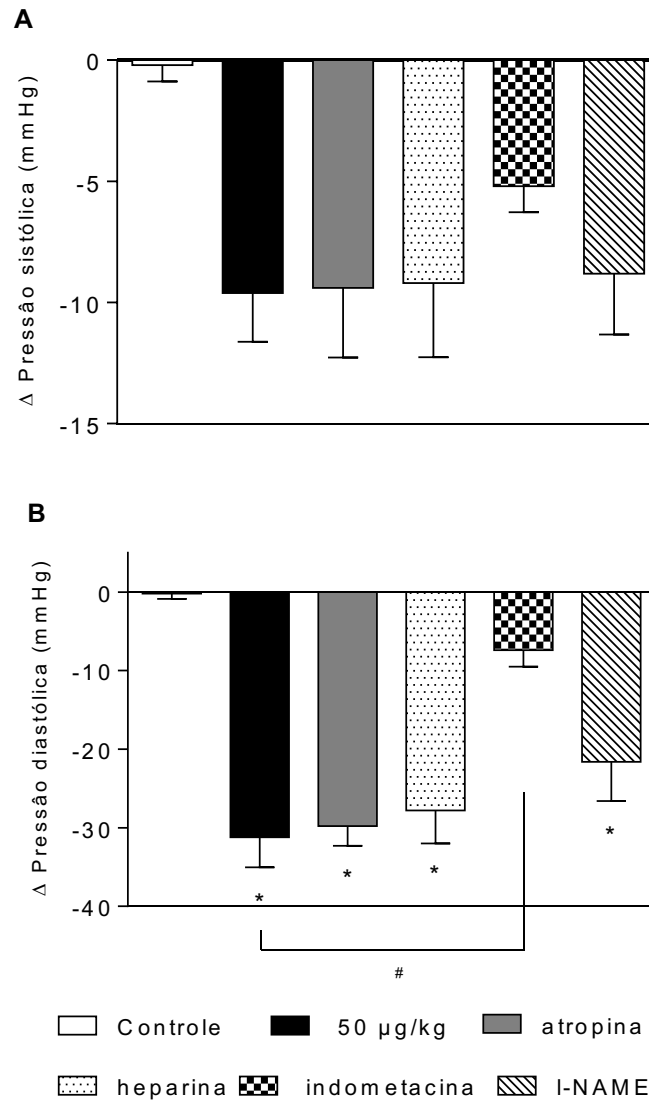
Somente a indometacina (INDO) foi capaz de bloquear parcialmente o efeito hipotensor induzido pela peçonha. Como já mostrado previamente, na ausência da INDO, a dose de 50 µg/kg de BIV, foi capaz de reduzir as pressões sistólica e diastólica em ratos anestesiados de  $120 \pm 4,5$  para  $110,4 \pm 2,0$  mmHg e  $80 \pm 2,5$  para  $48,8 \pm 3,8$  mmHg, respectivamente. Entretanto, na presença de INDO, esses valores pressóricos foram alterados para  $114,8 \pm 1,1$  e  $72,6 \pm 2,1$  mmHg, ou seja, na presença do inibidor da enzima ciclooxigenase, a redução nas pressões sistólica e diastólica foram atenuadas em aproximadamente 45% e 77%, respectivamente (fig. 13).

Pré-injeções do anticoagulante heparina (300 unidades/kg), do inibidor não seletivo da oxido nítrico sintase (L-NAME 10 mg/Kg) e do antagonista muscarínico atropina (5 mg/kg) não causaram alteração nos efeitos hipotensores observados após a injeção da BIV.



**Figura 12: Efeitos na pressão arterial de doses subsequentes *versus* dose única da peçonha de *B. leucurus*.** A figura mostra o decréscimo do efeito hipotensor de BIV quando administrado em doses subsequentes em comparação com a injeção em dose única. (A) pressão sistólica e (B) pressão diastólica. Os dados estão expressos como média±EPM. As diferenças foram consideradas quando  $*p < 0,05$  em comparação ao grupo controle. N = 5.

A pressão arterial e a frequência cardíaca basal, não sofreram alterações durante os períodos de pré-tratamento, assim como nos experimentos anteriores, não houve alteração na frequência cardíaca após a injeção da BIV.



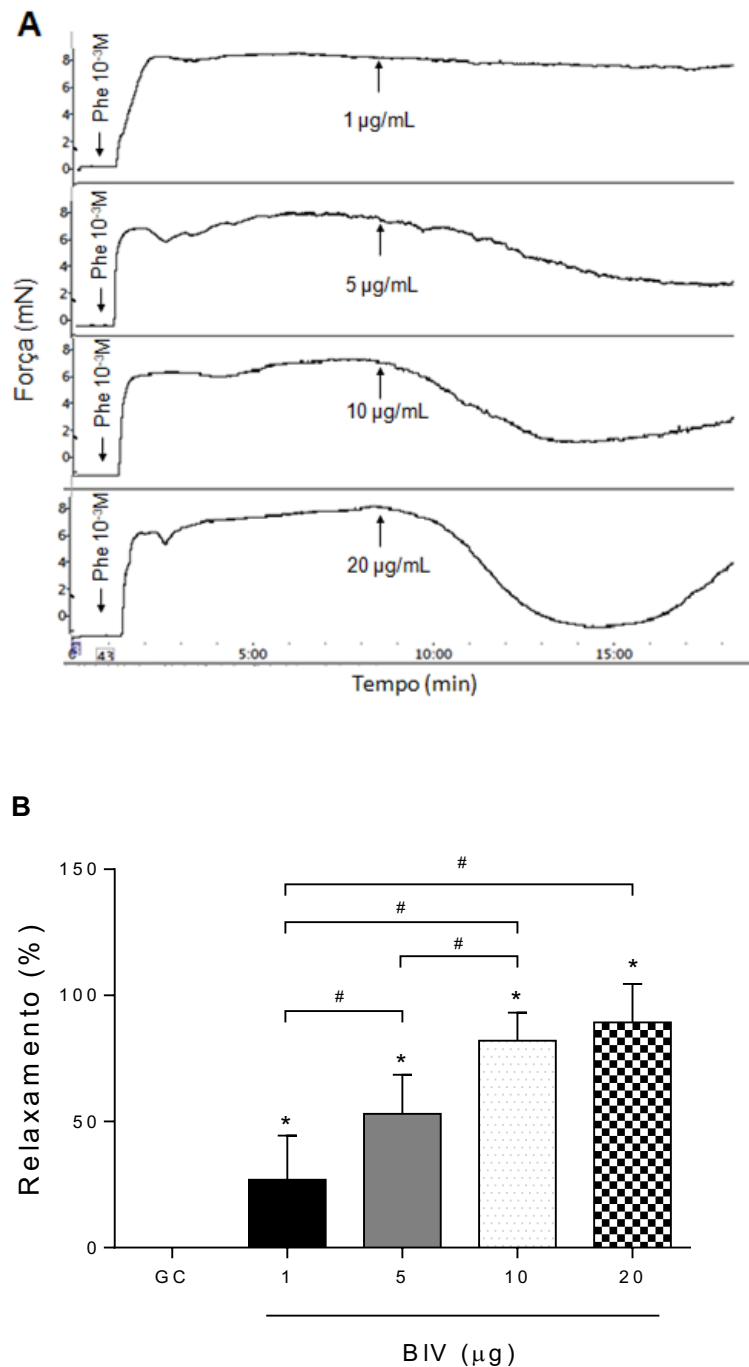
**Figura 13: Estudo dos mecanismos envolvidos nas alterações hemodinâmicas induzidas pela peçonha de *B. leucurus*.** A figura mostra os efeitos do pré-tratamento com diferentes drogas na resposta hemodinâmica induzida pela BIV. Os efeitos são observados na pressão sistólica (A) e na pressão diastólica (B). Os dados estão expressos como média±EPM. As diferenças foram consideradas quando \* $p<0,05$  em comparação ao grupo controle e # $p<0,05$  em comparação ao grupo sem pré-tratamento. N = 5.



### 5.1.3 Reatividade vascular em anéis isolados de artéria mesentérica

O efeito da peçonha de *Bothrops leucurus* na reatividade vascular foi avaliado em anéis íntegros isolados de artéria mesentérica pré-contráídos com fenilefrina.

Os resultados mostram que a BIV é capaz de induzir resposta vasodilatadora de maneira dose-dependente nos vasos analisados. A figura 14 apresenta os registros típicos obtidos durante o experimento, bem como os dados obtidos após as análises de todos os animais. As doses de 1, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  da peçonha, induziram relaxamento de  $26,9 \pm 7,2\%$ ,  $53,1 \pm 6,3\%$  e  $82,1 \pm 4,5\%$  respectivamente, enquanto a dose de 20  $\mu\text{g/mL}$  levou ao relaxamento quase total do vaso ( $90 \pm 6\%$ ). A resposta vasodilatadora induzida pela peçonha ocorre imediatamente após sua administração, atingindo resposta máxima em aproximadamente 10 minutos, com recuperação progressiva após 15 minutos.



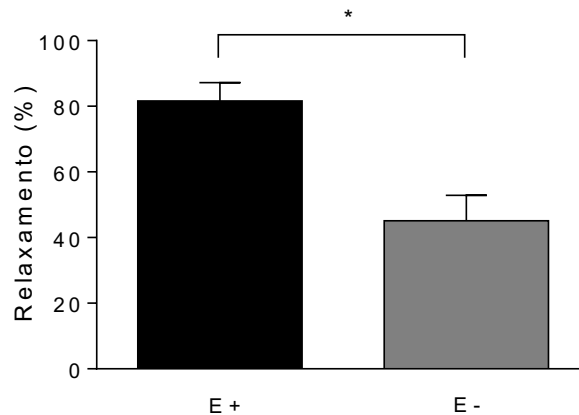
**Figura 14: Efeitos da BIV na reatividade vascular de anéis isolados de artéria mesentérica de ratos.** (A) Registros típicos de diferentes doses (1, 5, 10 e 20 µg/mL) da BIV na reatividade vascular de vasos pré-contraídos com fenilefrina (10<sup>-3</sup> M). (B) Curva dose-resposta da BIV indicando ação vasodilatadora de maneira dose-dependente. Os dados estão expressos como média±EPM. As diferenças foram consideradas quando \**p*<0,05 em comparação com o vaso em estado de contração máxima, grupo controle (GC) e #*p*<0,05 em múltiplas comparações. N = 6.

#### 5.1.4 Participação do endotélio vascular na resposta à peçonha de *Bothrops leucurus*

O efeito da BIV - 10  $\mu\text{g/mL}$  - também foi avaliado em vasos isolados após a remoção de seu endotélio, visando verificar o seu envolvimento no relaxamento vascular induzido pela peçonha.

O relaxamento no vaso após remoção endotelial foi significativamente menor ( $45,1 \pm 7,7\%$  de relaxamento), quando comparado a resposta em anéis de mesentérica com endotélio intacto ( $81,6 \pm 5,6\%$ , E+) (fig. 15).

Estes resultados mostram que a resposta vascular induzida pela peçonha, possivelmente envolve componentes tanto do endotélio como também do músculo liso vascular.



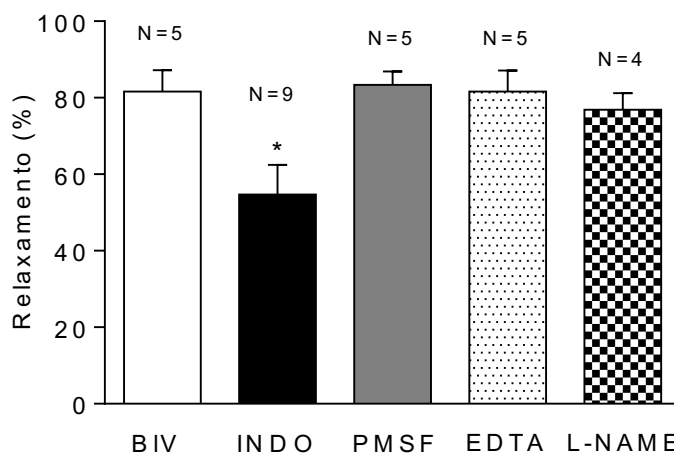
**Figura 15: Participação do endotélio vascular na resposta à peçonha de *B. leucurus*.** O gráfico mostra a diferença na reatividade vascular induzida pela BIV (10  $\mu\text{g/mL}$ ) entre vasos íntegros (com endotélio, E+) e desnudos (sem endotélio, E-). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. As diferenças foram consideradas quando  $*p < 0,05$ . N = 5.

### 5.1.5 Estudo da via envolvida no relaxamento vascular

Na tentativa de identificar as vias envolvidas no relaxamento vascular induzido pela peçonha de *Bothrops leucurus*, foi investigado a participação de prostanóides e do óxido nítrico na vasodilatação induzida pela peçonha em anéis isolados de artéria mesentérica íntegros. Esse ensaio foi realizado utilizando a dose de 10  $\mu\text{g/mL}$  de BIV (fig. 16).

Corroborando com os ensaios *in vivo* (fig. 13), foi observado que a via dos prostanóides está envolvida na vasodilatação induzida pela peçonha de *B. leucurus*. Na presença do inibidor da ciclooxygenase (INDO - 10  $\mu\text{M}$ ), o relaxamento vascular induzido pela BIV foi atenuado em ~30% ( $81 \pm 5,6\%$  para  $54,7 \pm 7,8\%$  de relaxamento) (fig. 16).

De forma semelhante, L-NAME (300  $\mu\text{M}$ ) não provocou efeito na vasodilatação induzida pela BIV, sugerindo que não há envolvimento do óxido nítrico nessa vasodilatação.



**Figura 16: Estudo da via de relaxamento vascular.** Histograma representando os efeitos vasculares induzidos pela BIV (10  $\mu\text{g/mL}$ ) isoladamente e na presença de Indometacina (INDO), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etilenodimetil tetracético (EDTA) e N-nitroargininametilester (L-NAME). Os

dados estão expressos como média±EPM. As diferenças foram consideradas quando  $*p<0,05$  comparados com o grupo controle.

Ainda nesse experimento, o envolvimento das proteases presentes na peçonha foi avaliado no relaxamento vascular. Para isso, foram utilizados inibidores específicos das duas principais classes de proteases (serinoproteases e metaloproteases) comumente encontrada em peçonhas botrópicas.

Não foi observada alteração da resposta vascular induzida pela peçonha, quando essa foi incubada com os inibidores específicos (PMSF e EDTA inibidores de serino- e metaloproteases respectivamente).

Isoladamente, nas doses utilizadas, nenhum dos inibidores interferiram na reatividade vascular.

## **5.2 Neutralização dos efeitos cardiovasculares pelo soro antibotrópico**

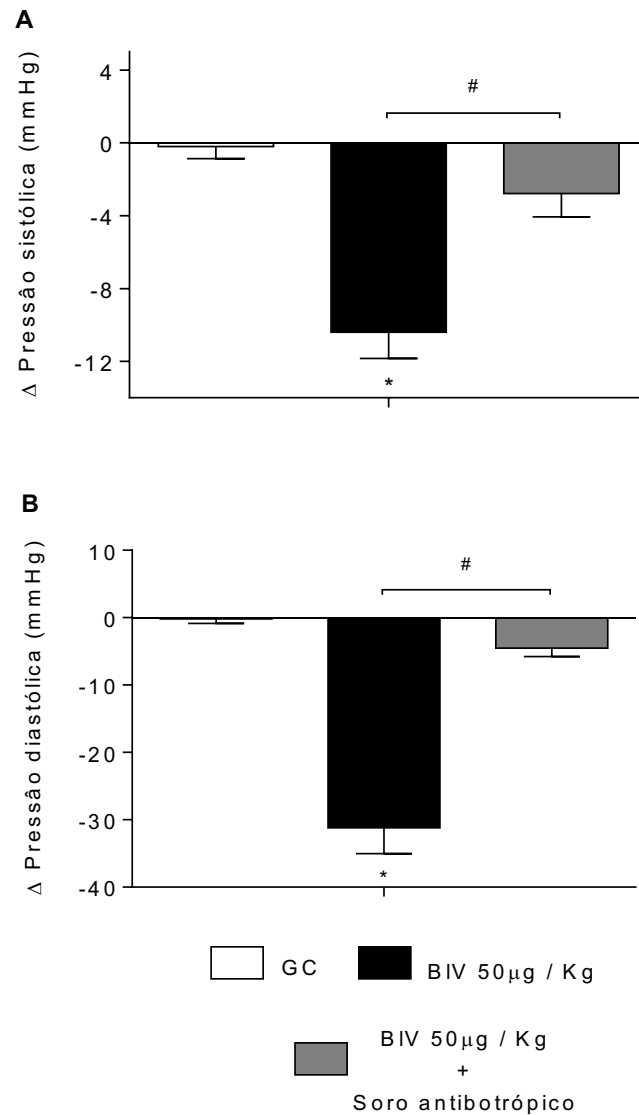
A habilidade do soro antibotrópico pentavalente em neutralizar os efeitos cardiovasculares induzidos pela BIV, foi avaliado tanto *in vivo* sobre ratos anestesiados, como *in vitro* em anéis isolados de artéria mesentérica. Para ambos os experimentos, o soro antibotrópico foi pré-incubado com a peçonha por 5 minutos a 37°C antes do uso.

### **5.2.1 Neutralização dos efeitos cardiovasculares in vivo**

Em ratos anestesiados, o soro antibotrópico foi capaz de neutralizar parcialmente a resposta hipotensiva causada pela peçonha de *B.leucurus* (50 µg/kg), quando utilizada a relação peso da peçonha / volume soro recomendada pelo fabricante (Fig. 17).

Como já descrito anteriormente, essa dose de peçonha é capaz de provocar uma redução nas pressões sistólica e diastólica em ratos. A pré-incubação do soro antibotrópico com esta dose pré-estabelecida de BIV, foi capaz de atenuar os efeitos hemodinâmicos nas pressões sistólica e diastólica em 48% e 85%, respectivamente.

Após a neutralização, os valores das pressões sistólica e diastólica foram (em mmHg) de  $117,2 \pm 1$  e  $75,5 \pm 1,3$  respectivamente (fig. 17). A frequência cardíaca se manteve inalterada. Administração do veículo (PBS) e do soro antibotrópico não tiveram efeitos significativos sobre os parâmetros analisados.



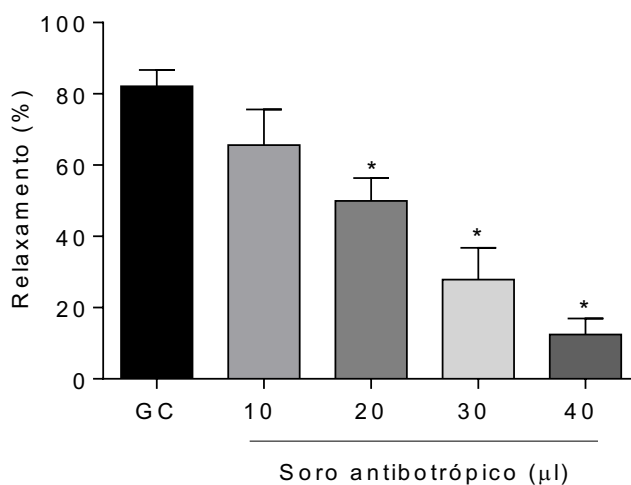
**Figura 17: Neutralização dos efeitos cardiovasculares *in vivo* pelo soro antibotrópico.** A figura apresenta os dados obtidos dos registros das pressões sistólica (A) e diastólica (B) após neutralização dos efeitos da BIV pelo soro antibotrópico. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. As diferenças foram consideradas quando \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (GC), que recebeu PBS e # $p < 0,05$  em múltiplas comparações.

### 5.2.2 Neutralização dos efeitos vasodilatadores *in vitro*

Após a confirmação que o soro antibotrópico foi capaz de reduzir os efeitos cardiovasculares *in vivo*, avaliamos o seu potencial protetor *in vitro* sobre os efeitos da peçonha em vasos íntegros, utilizando anéis isolados de artéria mesentérica.

Para isto quatro doses do soro antibotrópico (10, 20, 30 e 40  $\mu\text{L}$ ) foram incubadas com BIV (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Assim como nos ensaios *in vivo*, o soro antibotrópico também foi capaz de neutralizar os efeitos vasculares induzidos pela BIV *in vitro* (fig. 18).

Como já mostrado, a peçonha bruta isoladamente (10  $\mu\text{g/mL}$ ) é capaz de induzir um relaxamento vascular de  $81,6 \pm 5,6\%$ . Na presença das diferentes doses do soro antibotrópico, o relaxamento vascular induzido pela peçonha foi atenuado para  $65,6 \pm 9,9\%$  (10  $\mu\text{L}$  soro),  $49,9 \pm 6,4\%$  (20  $\mu\text{L}$  soro),  $27,8 \pm 8,9\%$  (30  $\mu\text{L}$  soro) e  $12,5 \pm 4,5\%$  (40  $\mu\text{L}$  soro).



**Figura 18: Neutralização dos efeitos cardiovasculares *in vitro* pelo soro antibotrópico.** A figura apresenta os dados obtidos da reatividade vascular após neutralização dos efeitos de BIV (10  $\mu\text{g/mL}$ ) por diferentes doses de soro antibotrópico. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. As diferenças foram consideradas quando  $*p < 0,05$ . GC = grupo controle (BIV 10  $\mu\text{g/mL}$  + PBS).

Esses resultados mostram que a neutralização da vasodilatação pelo soro antibotrópico é soro-dose dependente. A curva de neutralização é mostrada na figura 18. Nas doses utilizadas, o soro antibotrópico isoladamente não afetou a reatividade vascular dos vasos.

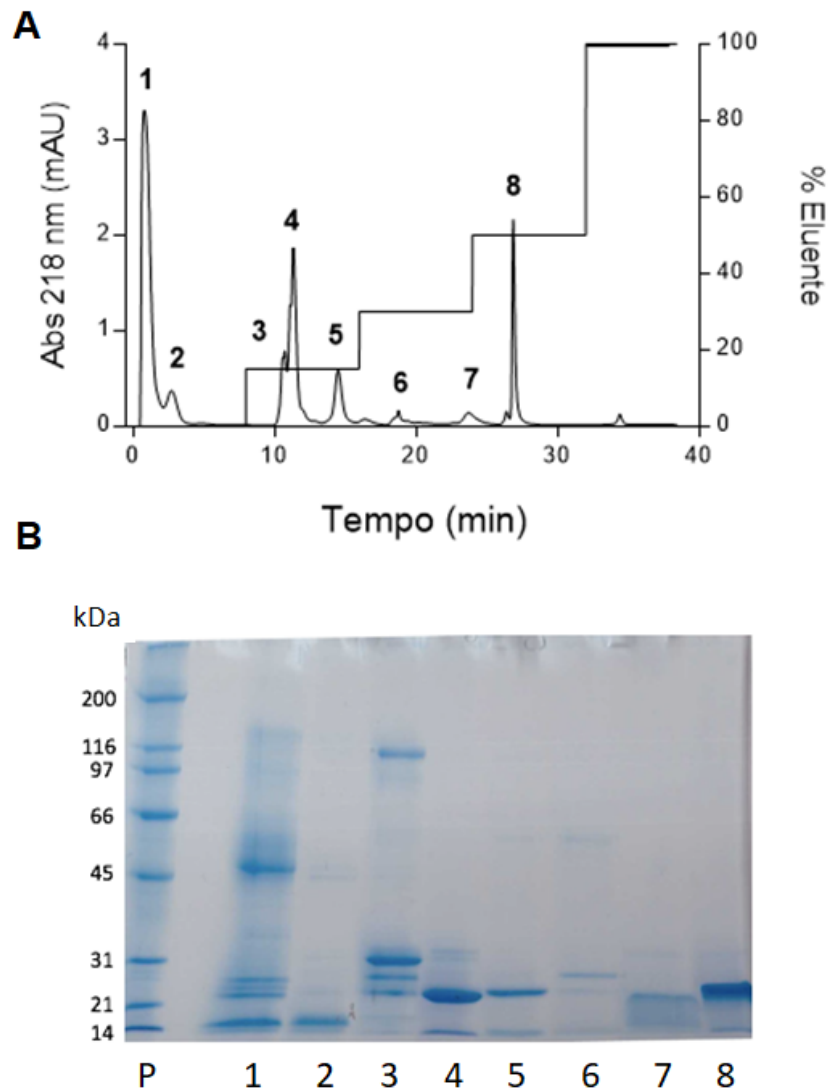
### **5.3 Purificação da fração responsável pelos efeitos cardiovasculares da peçonha de *Bothrops leucurus***

#### **5.3.1 Primeira etapa da purificação: Cromatografia de troca catiônica em coluna WCX-I**

A primeira etapa da purificação consistiu no fracionamento do veneno bruto por cromatografia de troca iônica em etapas isocráticas. Esse processo separou a BIV em 8 frações principais: BI-1, BI-2, BI-3, BI-4, BI-5, BI-6, BI-7 e BI-8, pela diferença de carga elétrica líquida em pH 7,4 (fig. 19A).

Após processamento das frações (diálise, liofilização e dosagem de proteínas), o grau de homogeneidade destas foi avaliado por SDS-PAGE (fig. 19B) e a atividade cardiovascular foi monitorada.





**Figura 19: Primeira etapa de purificação da peçonha de *B. leucurus*.** (A) Cromatografia de troca iônica. Coluna Shim-pack WCX-1, 4 x 50 mm (Shimadzu), equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH = 7,4 (eluente A). As frações foram eluídas com tampão tampão fosfato de sódio 20 mM pH = 7,4 contendo 1 M de NaCl em 5 etapas isocráticas: 1ª etapa - 8 minutos em eluente A; 2ª etapa - 8-16 minutos em 15% de eluente B; 3ª etapa - 16-24 minutos em 30% de eluente B; 4ª etapa - 24-32 minutos em 50% de eluente B; 5ª etapa - 32-45 minutos em 100% de eluente B. Amostra: BIV (5 mg de proteínas). Fluxo de 0,5 mL/min. O conteúdo proteico do eluato foi detectado pela leitura da absorbância a 218/280 nm. (B) Perfil eletroforético (SDS-PAGE, gradiente de 7,5-15%) das frações eluídas da primeira etapa de purificação, identificadas pelos números de 1 a 8. P = padrão de massa molecular.

O perfil eletroforético demonstrou que o processo de fracionamento foi efetivo, o que é demonstrado pela presença de diversos componentes com migrações distintas presentes nas oito frações. A efetividade deste fracionamento, também foi avaliada pelo monitoramento da atividade das frações obtidas, sobre a reatividade vascular em anéis isolados de mesentérica. As frações foram avaliadas individualmente na dose de 1 µg/mL.

Os resultados mostraram que somente as frações BI-1 e BI-5 (eluídas com 0% e 15% de sal) são capazes de provocar alterações na reatividade vascular. Estas frações reproduziram as alterações induzidas pela peçonha bruta, causando um rápido relaxamento vascular nos primeiros 10 minutos, com progressiva recuperação subsequente. Nessa concentração, o relaxamento vascular provocado foi de 14,86% para BI-1 e 26,64% para BI-5 (dados não mostrados).

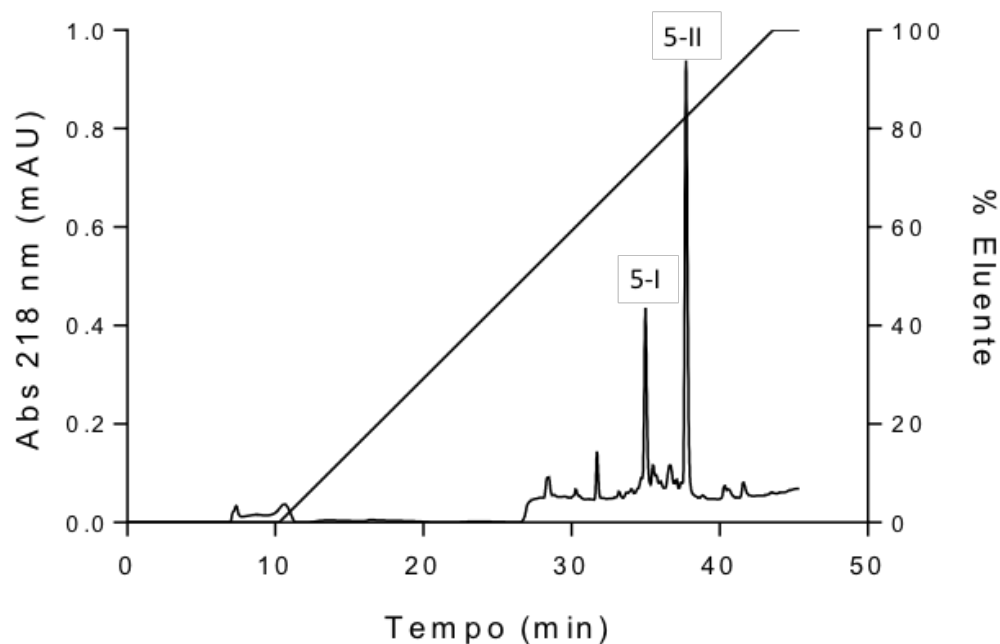
O perfil proteico obtido por SDS-PAGE, mostra que a fração BI-1, contém vários componentes proteicos, como massas moleculares aparentes entre 14 a 120 kDa. Já a fração BI-5 contém dois componentes principais com massa molecular estimadas em aproximadamente 20 kDa e 15 kDa.

Considerando que a fração BI-5 foi obtida após a introdução do gradiente na coluna – resolvida na cromatografia – e que sua reatividade vascular específica foi maior que a da BI-1, esta fração foi selecionada para a próxima etapa de purificação. Esta fração correspondeu a ~10% do material proteico aplicado à coluna.

### *5.3.2 Segunda etapa de purificação: Cromatografia de fase reversa em coluna C18*

A segunda etapa de purificação consistiu em uma cromatografia de fase reversa em coluna C18. A amostra BI-5 (obtida na primeira etapa) foi fracionada em dois picos proteicos principais, BI-5-I (eluído com 31% de ACN) e BI-5-II (eluído com 54% de ACN). As duas frações foram eluídas em picos simétricos, o que sugere homogeneidade das amostras.

O perfil cromatográfico obtido está mostrado na figura 20, e esta de acordo com o perfil proteico da fração BI-5 obtido por SDS-PAGE.



**Figura 20: Perfil cromatográfico da fase reversa da fração 5 proveniente da WCX-1.** Coluna Jupiter C18 300A, 4,6 x 250 mm (Phenomenex), equilibrada com solução H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% v/v (eluyente A). A eluição ocorreu em gradiente linear 0-100% de ACN/TFA 0,1% v/v (eluyente B) por 45 minutos. Amostra: Fração 5 (500 µg de proteínas). Fluxo de 0,5 mL/min. O conteúdo proteico do eluato foi detectado pela leitura da absorbância a 218/280 nm.

Partindo-se de 5 mg do veneno bruto no início do processo de purificação, obteve-se ~100 µg (BI-5-I) e 200µg (BI-5-II). Estas frações foram então liofilizadas e submetidas a análise de pureza, massa molecular e atividade cardiovascular.

#### 5.4 Espectrometria de massa MALDI-ToF e MALDI-MSD

A pureza e a massa molecular das amostras BI-5-I e BI-5-II foram avaliadas por espectrometria de massa MALDI-ToF em modo positivo/refletor. No espectro de massa da fração BI-5-I observa-se um pico de grande intensidade (íon molecular) com massa correspondente a 13.889,975 Da (fig. 21A).

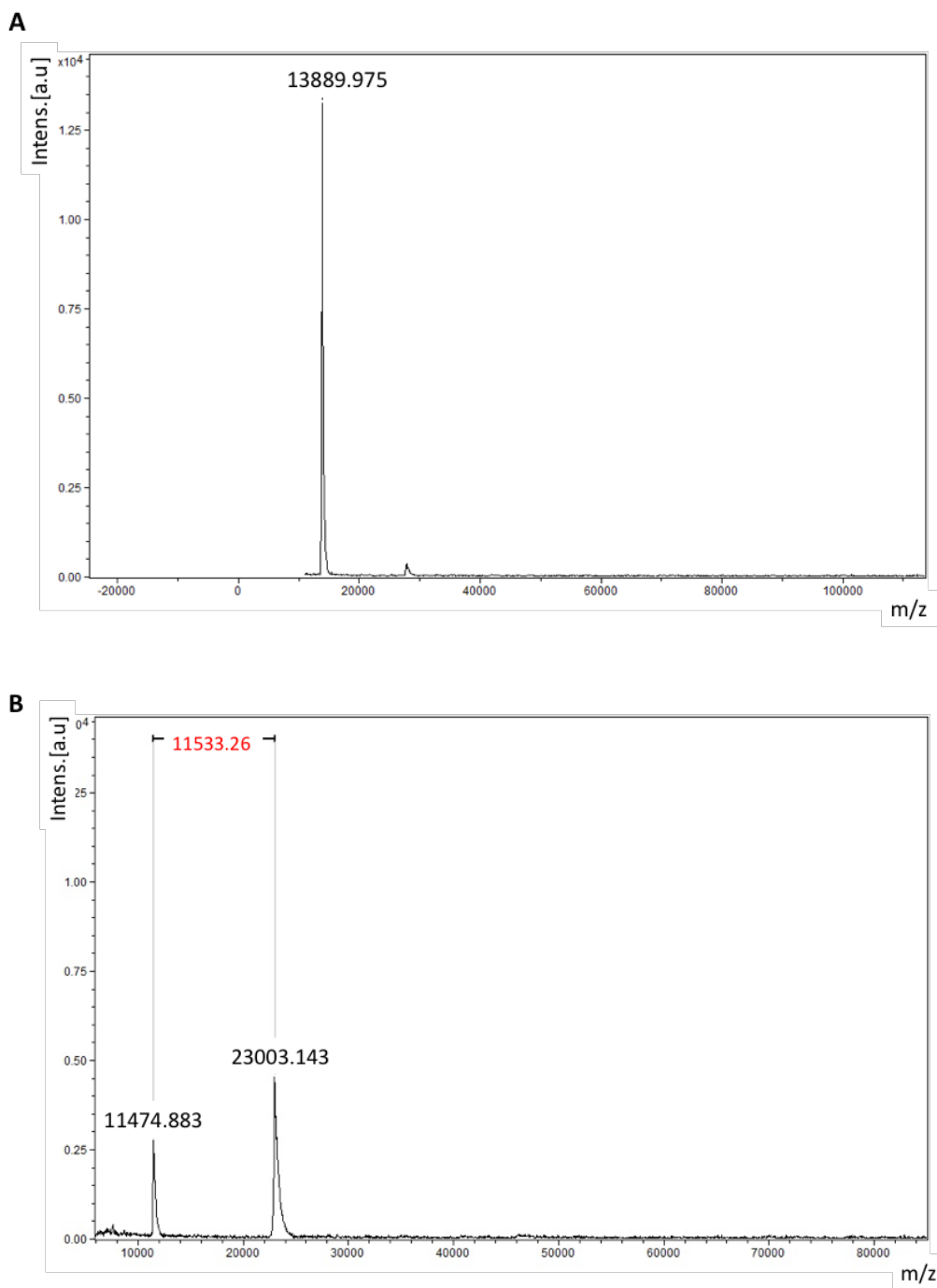
No espectro também se observa um pico de baixa intensidade com massa molecular correspondente ao dobro da do pico principal (~28.000 Da). Esta massa pode ser atribuída a uma agregação dimérica desta molécula.

O espectro de massas da BI-5-II é mostrado na figura 21B. É possível observar neste espectro a presença de duas massas moleculares (dois picos no espectro). O de maior intensidade corresponde ao íon molecular (massa de 23.003,143 Da). O pico de menor intensidade possui a metade dessa massa, sendo possivelmente referente à mesma molécula duplamente carregada.

Esses dados demonstram que as frações obtidas na cromatografia de fase reversa, são amostras homogêneas (apresentam um único componente proteico), com massas de 13.889,975 Da e de 23.003,143 na BI-5-I e BI-5-II, respectivamente. Essas massas corroboram com os valores calculados para SDS-PAGE da fração BI-5 (fig. 19B).

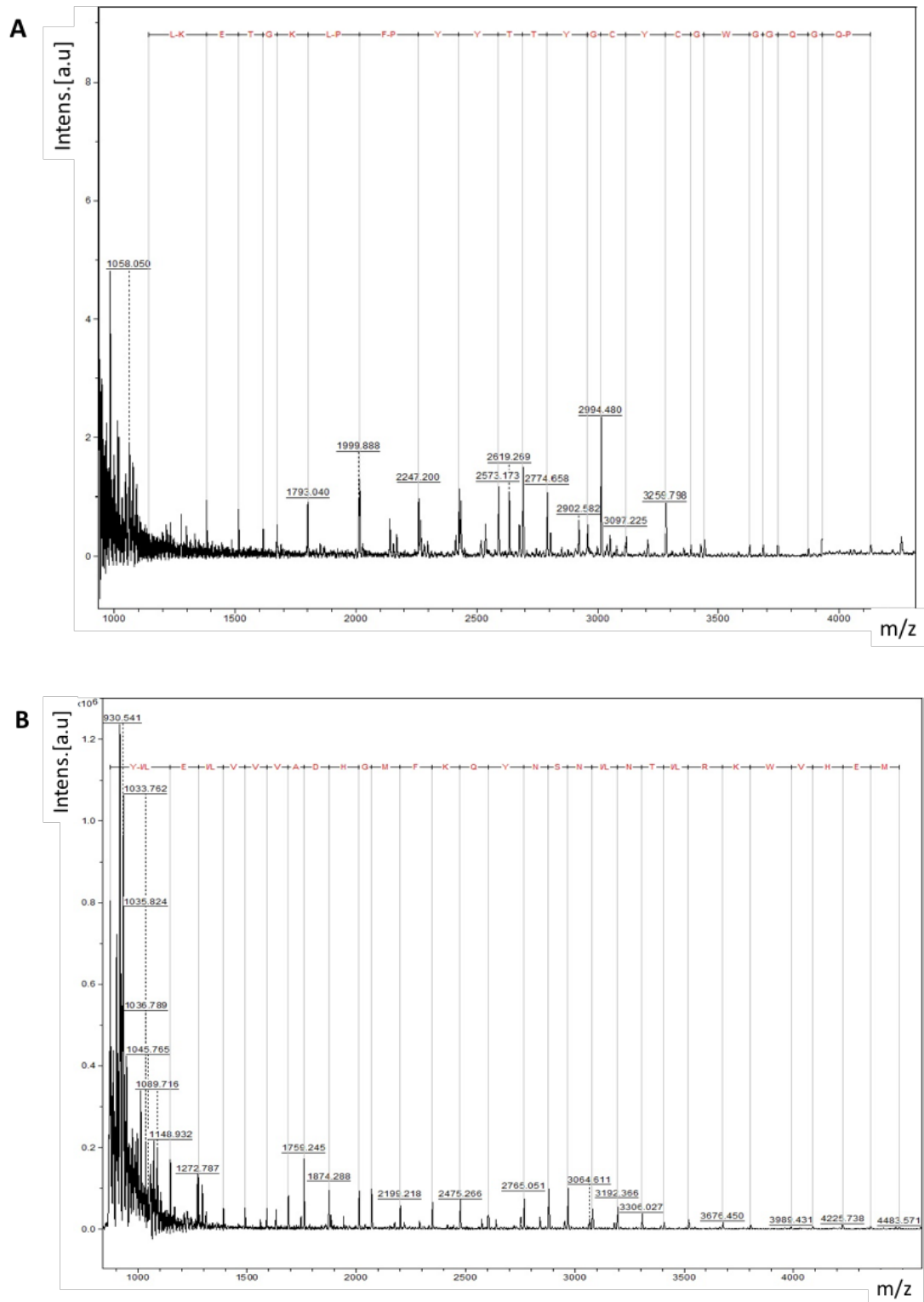
Após certificar a homogeneidade das amostras proteicas obtidas, estas foram posteriormente fragmentados por MALDI-MSD para obtenção de sequência parcial de aminoácidos destas moléculas. A fragmentação dessas moléculas permitiu a determinação de uma sequência de 27 e 30 resíduos de aminoácidos de BI-5-I e BI-5-II, respectivamente (fig. 22).

A tabela 2 apresenta as principais características químicas das proteínas purificadas.



**Figura 21: Espectros de massa das frações BI-5-I e BI-5-II utilizando a metodologia de MALDI-ToF.**

(A) espectro de massa da fração BI-5-I revelando um pico de grande intensidade (íon molecular) com massa correspondente a 13.889,975 Da. (B) Espectro de massa da fração BI-5-II revelando a presença de duas massas moleculares (dois picos no espectro). O de maior intensidade corresponde ao íon molecular (massa de 23.003,143 Da).



**Figura 22: Fragmentação e obtenção da sequência parcial de aminoácidos de BI-5-I e BI-5-II.** Utilizando a metodologia de MALDI-MS, foi possível obter sequências de 27 e 30 aminoácidos de BI-5-I (em A) e BI-5-II (em B) respectivamente.

**Tabela 3 - Características químicas das proteínas purificadas.**

AMOSTRAS	MASSA MOLECULAR (SDS-PAGE)	MASSA MOLECULAR (MALDI-TOF)	SEQUÊNCIA DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS (MALDI-MS)
BI-5-I	≈ 15 kDa	13.889,975 Da	LKETGKLPPYYTTYGCYCGWGGQGQP
BI-5-II	≈ 20 kDa	23.003,143 Da	YIELVVADHGMFKQYNSNLNTIRKVVHEM

### 5.5 Análise de homologia sequencial utilizando banco de dados

As sequências de aminoácidos obtidas, foram comparadas e alinhadas utilizando o programa BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool), do NCBI (**N**ational **C**enter for **B**io**t**echnology **I**nformation). O banco de dados utilizado foi o UniProtKB/Swiss-Prot.

Essas sequências foram inseridas no banco de dados para uma pesquisa de homologia com sequências de proteínas já depositadas nesse banco. O resultado da busca mostrou que a sequência identificada na amostra BI-5-I (27 resíduos) é homóloga a um domínio muito conservado na superfamília das fosfolipases A<sub>2</sub>, e que a sequência identificada da amostra BI-5-II (30 resíduos) é referente a um domínio muito conservado na superfamília das metaloproteases dependentes de zinco (fig. 23A).

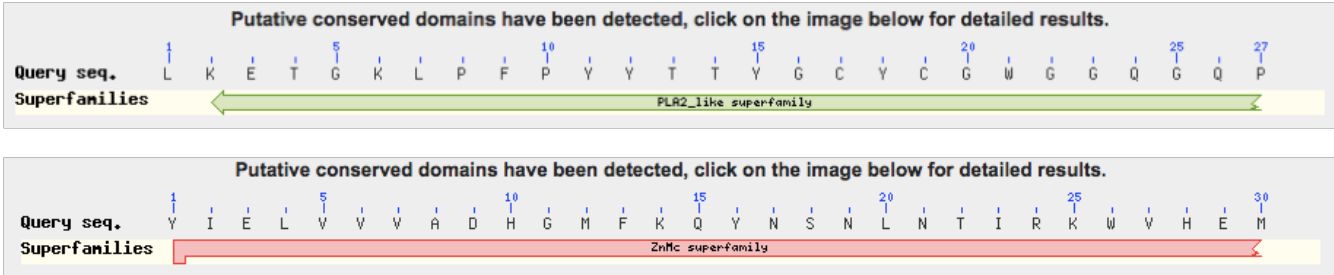
Utilizando a ferramenta de múltiplo alinhamento COBALT (**C**onstraint-**B**ased **A**lignment **T**ool) do NCBI, as sequências identificadas foram alinhadas e comparadas com sequências completas de proteínas similares de outras espécies de serpentes botrópicas. O alinhamento mostrou que a sequência de aminoácidos identificadas para BI-5-I apresenta homologia de 100% com (bID-PLA<sub>2</sub>) de *Bothrops leucurus*, 100% com (BJU- PLA<sub>2</sub>) de *Bothrops jararacussu* e 92% com (BAP- PLA<sub>2</sub>) de *Bothrops asper* (fig.

23B). Também mostrou que Bl-5-II apresenta 100% de homologia com (leuc-a – SVMP) de *Bothrops leucurus* e 89% de homologia com (Bm-MP-I – SVMP) de *Bothrops moojeni* (fig. 22C).

Em conjunto, nossos dados confirmam que as duas proteínas isoladas na cromatografia de fase reversa, correspondem a bID-PLA2 - fosfolipase A2 - e a leucurolisina-a – SVMP P-I - da peçonha de *Bothrops leucurus*.



A



B

					Identidade
B1-PLA2	1	-----DLWQFGQMI	LKETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDCCYGKLTNCKPKTDRY	64	100%
BJU-PLA2	1	MRTLWIMAVLLVGVEGDLWQFGQMI	LKETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDCCYGKLTNCKPKTDRY	80	100%
BAS-PLA2	1	MRTLWIMAVLLVGVEGSLIEFAKMI	LEETKKLPFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDCCYGKLSNCKPKTDRY	80	92%
B1-PLA2	65	SYSRENGVIICGEGTPCEKQICECDKAAAVCFRENLR	TYKXXYMAYPDVLCKKPAEKC	122	
BJU-PLA2	65	SYSRENGVIICGEGTPCEKQICECDKAAAVCFRENLR	TYKKRYMAYPDVLCKKPAEKC	138	
BMO-PLA2	65	SYSRKSGVIICGEGTPCEKQICECDKAAAVCFRENLP	TYKKRYMAYPDIFCKKPAEEC	138	

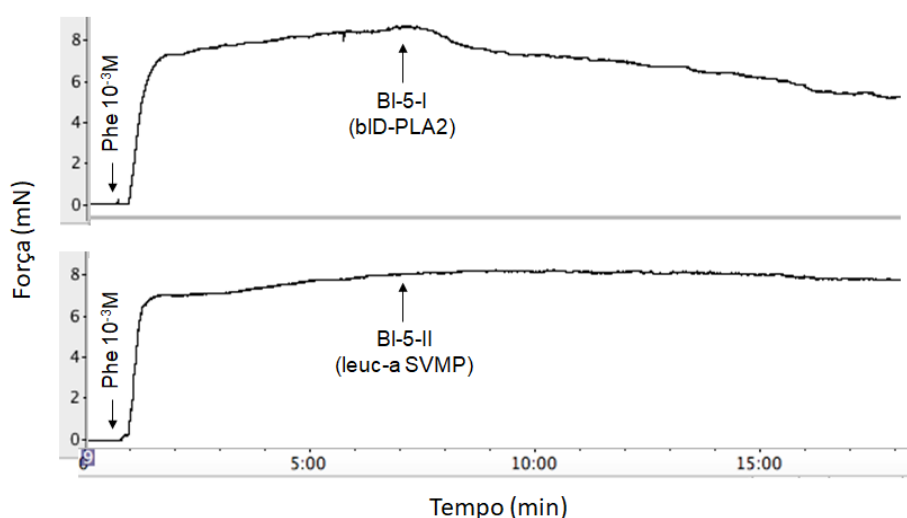
C

Leuc-a	1	--QQFSPRYIELVVADHGMFKKYN	SNLNTIRKWVHEMLNTVNGFFRSMNVDASLVNLEVWSSKDLIKVEKDSSKTLTSF	78	97%
Bm-MP-I	1	EQQKFSPRYIELVVADHGMFKKYN	SNLNTIRKWVHEMVNSMNGFYRSVDVTASLANLEVWSSKDLINVQKDSRETLKSF	80	97%
Leuc-a	79	GEWRERDLLPRISHDHAQLLT	VI FLDEETIGIAYTAGMCDLSQSVAVVMDHSSKKNLRVAVTMAHELGHNLGMRHDGNQCH	158	
Bm-MP-I	81	GEWRERDLLPRISHDNAQLLT	AI VFDGHTIGRAYTGGMCDPRHSVGVVMDHSPKNLQVAVTMAHELGHNLGMHHDGNQCH	160	
Leuc-a	159	CNAPSCIMADTLSKGLSFEFS	DCSQNQYQTYLTKHNPQCILNKP-	202	
Bm-MP-I	161	CDAASCIMADSLSVLSYEF	SDCSQNQYQTYLTKHNPQCILNEPL	205	

**Figura 23: Análises das sequências de aminoácidos obtidas.** Análise de identidade utilizando a ferramenta BLAST. A sequência de 27 resíduos determinados para BI-5-I, é homóloga a um domínio conservado da superfamília das fosfolipases A2 enquanto que a sequência de 30 resíduos da BI-5-II, é homóloga a um domínio da superfamília das metaloproteases dependentes de zinco (A). Alinhamento múltiplo das sequências obtidas com sequências completas de fosfolipases A2 (B) e metaloproteases (C) conhecidas utilizando a ferramenta COBALT. Os resíduos destacados em cinza, representam a identidade revelada pelo MALDI-MSD. Os resultados mostram que as sequências identificadas apresentam alta homologia com proteínas similares presentes em outras peçonhas botrópicas.

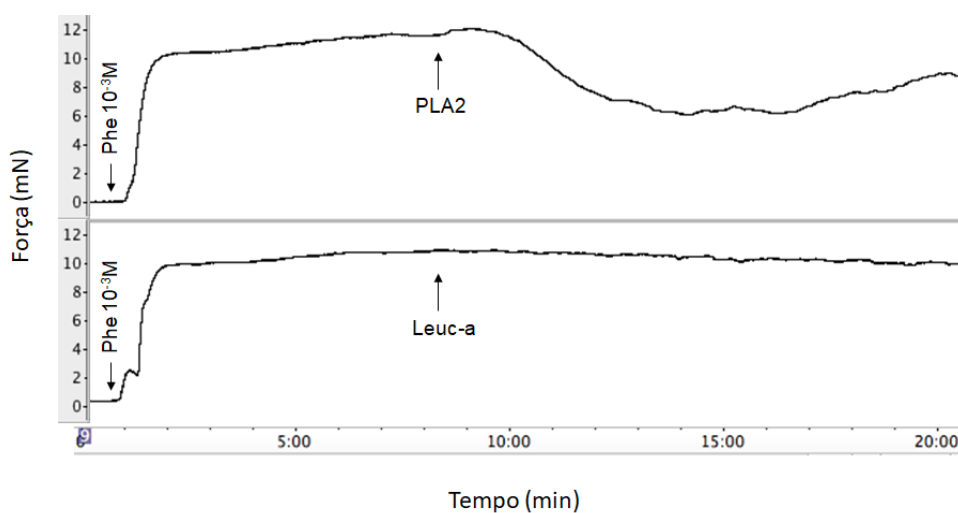
## 5.6 Avaliação da reatividade vascular das proteínas obtidas após a purificação

Para avaliar a respostas das proteínas purificadas (bID-PLA2 e leuc-a – SVMP) sobre a reatividade vascular, amostras - dose de 1  $\mu\text{g/mL}$  - foram aplicadas em anéis de artéria mesentérica pré-contráídos, nas mesmas condições descritas para a peçonha bruta. Foi possível observar que somente bID-PLA2 - na dose testada - é capaz de provocar relaxamento vascular em anéis de artéria mesentérica. Os registros desses efeitos na vasculatura é mostrado na figura 24, onde foi possível observar um relaxamento de ~38%.



**Figura 24: Efeito das proteínas purificadas na reatividade vascular.** Registros típicos da reatividade vascular após a injeção de BI-5-I (bID-PLA2) e BI-5-II (leuc-a – SVMP).

Para confirmar os resultados vasculares obtidos com as proteínas purificadas neste trabalho, testou-se a atividade de bID-PLA2 e leuc-a ( $1\mu\text{g/mL}$ ) purificadas pelo Laboratório de Bioquímica de Venenos Animais (LBVA) da Fundação Ezequiel Dias. De maneira similar, somente bID-PLA2 foi capaz de induzir relaxamento vascular em anéis isolados de artéria mesentérica. O relaxamento foi de  $\sim 47\%$  (fig. 25).



**Figura 25: Confirmação dos resultados vasculares.** Registros típicos da reatividade vascular após de bID-PLA2 e leuc-a – SVMP, cedidas pelo Laboratório de Bioquímica de Venenos de Animais da Fundação Ezequiel Dias.

# ***Discussão***

## 6 DISCUSSÃO

Um grande número de pesquisas, desde a antiguidade até a atualidade, tem sido realizado em todo mundo para desvendar o “*puzzle*” que são as peçonhas animais, demonstrando a importância desta área “a toxinologia” na ciência atual.

Essas peçonhas, por possuírem um vasto arsenal de moléculas bioativas com alvos altamente específicos no organismo da presa, como já descrito na introdução, são ferramentas para estudos de sistemas fisiológicos e também usadas como protótipo para desenvolvimento de novas substâncias com potencial farmacológico (Zelanis et al, 2010). Além disso, conhecimento sobre as peçonhas e de seus componentes, bem como seus mecanismos de ação são essenciais para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para acidentes causados por animais peçonhentos (para revisão, consulte Calvete, 2013).

Acidentes com serpentes do gênero botrópico, correspondem o maior número de envenenamentos no Brasil, sendo portanto suas peçonhas as mais estudadas quanto as suas atividades fisio-farmacológicas e caracterização bioquímica de seus componentes.

Os distúrbios cardiovasculares ocasionados por acidentes ofídicos - são uma das principais causas de morbidade e mortalidade relacionados ao envenenamento. Esses distúrbios podem ocorrer imediatamente após os acidentes, estando normalmente associados a liberação de substâncias vasoativas, ação cardiotóxica direta e ainda atuação sobre o sistema nervoso central ou podem ser distúrbios tardios (horas a dias após o envenenamento), sendo as respostas hemodinâmicas relacionadas principalmente a distúrbios da coagulação (Kamiguti e Sano-Martins, 1995) e hipovolemia decorrente de hemorragia sistêmica (Gutiérrez e Rucavado, 2000) levando ao choque hipovolêmico devido principalmente à ação das proteases das peçonhas (Rothchild e Rothchild, 1979).

Apesar de seu papel importante nos envenenamentos, os efeitos cardiovasculares dessas peçonhas têm sido menos explorados do que as outras atividades tóxicas, como a hemorrágica, anti- e pró-coagulantes (Bello et al, 2006; Gremski et al, 2007; Magalhães et al, 2007). Portanto, a compreensão dessas

alterações cardiovasculares é essencial para gerenciar melhor a terapêutica dos acidentes causados por essas serpentes.

O presente trabalho apresenta resultados inéditos sobre os efeitos cardiovasculares imediatos da peçonha da serpente *B. leucurus*, e demonstra a participação da fosfolipase A<sub>2</sub> presente nessa peçonha nestes eventos.

### 6.1 Efeitos hemodinâmicos *in vivo*

Os resultados do presente estudo mostram que em ratos anestesiados, a administração endovenosa da peçonha de *B. leucurus*, em doses subletais (10 a 100 µg/kg), produziu uma marcante hipotensão dose-dependente, que atinge seu máximo aproximadamente após 5 minutos, seguida por recuperação gradativa a valores próximos dos basais após 20 minutos.

Respostas similares, utilizando doses subletais, já foram documentadas em estudos com peçonhas de *Bothrops jararaca* (Rocha e Silva et al, 1949), *Bothrops marajoensis* (Evangelista et al, 2010), *Bothrops moojeni* (Santos et al, 2000), serpentes do gênero *Crotalus* (Russel et al, 1962; Carlson et al, 1975; Schaeffer et al, 1979), serpentes africanas (Hyslop e Marsh, 1991; Abdalla et al, 1992) e serpentes australianas (Chaisakul, et al, 2012; 2013).

Entretanto, na maior dose testada neste trabalho (200 µg/kg) a hipotensão foi progressiva, sem recuperação, levando a um colapso cardiovascular que progrediu para o óbito em alguns animais. Esse efeito também foi verificado em relação às respostas hemodinâmicas das peçonhas de *B. atrox* em ratos (Rodrigues, 2016) e *B. alternatus* em cães (Dias, 2012).

Alguns estudos sugerem que os mecanismos responsáveis por essa hipotensão são provavelmente multifatoriais, e podem envolver (i) sistema parassimpático (colinérgico) (Dias et al, 2016), (ii) a liberação de óxido nítrico induzida por componentes da peçonha atuando diretamente na vasculatura (p ex. serinoproteases afetando a coagulação sanguínea) (Glusa et al, 1991; Chaisakul, 2015), ou indiretamente pela liberação de fibrinopeptídeos (Aird, 2002) e (iii) pela liberação de mediadores endógenos, como as prostaglandinas, pelas fosfolipases A<sub>2</sub>

ou ainda liberação de bradicinina pelas enzimas análogas a calicreína (Evangelista et al, 2010; Chaisakul, et al, 2014; Felicori et al, 2003; Weinberg, 2004). A hipotensão observada pode ainda ser potencializada pelos peptídeos potencializadores de bradicinina presentes nessas peçonhas (Soares, 2005).

Ainda em relação aos efeitos *in vivo*, constatamos que apesar da marcante queda na pressão arterial, não foi observado alteração na frequência cardíaca nas doses testadas. Resposta semelhante também foi descrita para a peçonha de *Bothrops moojeni* (Santos et al, 2000) em cães e *Oxyuranus scutellatus* (Chaisakul et al, 2012) e *Pseudonaja textilis* (Chaisakul et al, 2013) em ratos. Santos e colaboradores (2000) sugeriram que a ausência de alteração na frequência cardíaca poderia ocorrer devido a um efeito parassimpático persistente, ou uma ação direta das peçonhas nos barorreceptores.

Um dado interessante que observamos foi que uma mesma dose da peçonha pode apresentar respostas hipotensoras diferentes em ratos que foram desafiados com doses prévias da peçonha quando comparado a animais que receberam essa mesma dose como dose única. Essa resposta é significativamente menor nos animais que já foram expostos às doses prévias da peçonha, quando comparada a animais que receberam a mesma dose pela primeira vez (dose única). Resultado semelhante foi descrito por Crachi e colaboradores (1999), que também demonstraram que a resposta hipotensora em ratos anestesiados, era marcadamente atenuada por uma aplicação prévia de outras doses da peçonha de *Oxyuranus scutellatus*.

Em um estudo mais recente utilizando ratos, Chaisakul e colaboradores (2012), propuseram que essa atenuação poderia ser causada pela liberação de mediadores endógenos, os quais seriam depletados em razão de aplicações prévias da peçonha de *Pseudonaja textilis*. Interessantemente, nesse mesmo estudo, verificou-se que esse efeito “protetor” de “doses prévias” era transiente (persistia por cerca de 30 minutos) perdendo seu efeito atenuante quando administrado 1 hora após à aplicação prévia. Esses resultados sugeriram que esses mediadores endógenos depletados eram restauradas após um curto período de tempo.

Analisando esses dados conjuntamente, pode-se sugerir que a resposta hipotensora imediata induzida pelas peçonhas ofídicas - como a que observamos -

não deve estar relacionada a depleção de fatores de coagulação, visto que esses demoram de 12-48 horas para serem restaurados dependendo do fator (8-12 h para os fatores V e VIII e 24-48 horas para o fibrinogênio) (Isbister et al, 2010). Levando em consideração o exposto acima, acreditamos que a hipotensão imediata induzida pela BIV não deve estar associada as coagulopatias, frequentes em envenenamentos ofídicos.

Uma vez que vários sistemas podem estar relacionados na regulação das funções cardiovasculares, estratégias farmacológicas (inibidores/antagonistas) foram utilizadas na tentativa de identificar a(s) via(s) envolvida(s) na hipotensão gerada pela BIV. Nestes experimentos os animais receberam 50µg/kg de BIV, 30 min após a administração de doses efetivas dos inibidores e antagonistas.

A administração prévia de atropina (antagonista muscarínico) e heparina (inibidor indireto da trombina) não foram capazes de inibir ou atenuar a resposta hipotensora induzida pela BIV. Esses dados sugerem que a resposta hemodinâmica induzida pela peçonha não envolve a participação direta do sistema parassimpático e das proteases pró-coagulantes intrínsecas da peçonha. Este último dado confirma o assumido acima, que provavelmente moléculas envolvidas no processo de coagulação não estariam associadas a resposta hipotensora imediata.

Tendo em vista a importante participação do endotélio vascular nas respostas pressóricas, e que o endotélio é capaz de regular o tônus vascular através da liberação de agentes vasodilatadores e vasoconstritores (Brenner et al, 1989; Vane et al, 1990; Vanhoutte, 1989), nós avaliamos o envolvimento de algumas substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio na resposta hipotensora induzida pela BIV.

As substâncias vasodilatadoras incluem o NO, a PGE<sub>2</sub> - PGI<sub>2</sub> e EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio). O NO é gerado nas células endoteliais por ação do óxido nítrico sintase (NOS), que promove a oxidação de nitrogênio guanidínico da L-arginina, formando NO e citrulina. O NO formado se difunde para o músculo liso vascular e estimula a formação do 3'5'- guanosina monofosfato cíclico (GMPc) pela ativação da guanilato ciclase solúvel (Rapoport e Murad, 1983). O GMPc ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), a qual reduz o influxo



de  $\text{Ca}^{2+}$  e sua liberação dos depósitos intracelulares ocasionando o relaxamento muscular.

As  $\text{PGE}_2$  e  $\text{PGI}_2$ , produtos da ciclooxigenase (COX) são derivadas do ácido araquidônico - liberado de fosfolipídios de membrana por ação da fosfolipase  $\text{A}_2$  - além de ser um potente inibidor da agregação plaquetária, promove relaxamento vascular por aumentar os níveis de AMPc no músculo liso. O AMPc, ativa proteínas quinases A (PKA) que, por sua vez, leva à hiperpolarização das células musculares lisas e consequente relaxamento. Já o EDHF segundo Campbell e Harder (2001), é uma substância capaz de promover o relaxamento vascular dependente do endotélio, mas independente da COX e da NOS e bloqueado por antagonistas de canais de  $\text{K}^+$ .

Neste trabalho, foi observado que o pré-tratamento dos animais com o inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) não foi capaz de abolir a resposta hipotensora do BIV, sugerindo que esta resposta não envolve a liberação do óxido nítrico (NO). Por outro lado, a indometacina - inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX) - foi capaz de bloquear em  $\approx 50$  e 70% respectivamente, a queda da pressão sistólica e diastólica induzida pela BIV. Este dado demonstra claramente que o efeito hipotensor agudo da BIV envolve a via de produção de prostanoídes, induzindo um aumento na liberação de prostaglandinas, prostaciclina e/ou tromboxanos, os quais devem contribuir de forma efetiva para esse efeito.

De fato, alguns trabalhos (Chaisakul, 2012; 2013; Rodrigues, 2016), demonstram que essa via possui grande influência na resposta hipotensora provocada pelas peçonhas de *Oxyuranus scutellatus* e *Bothrops atrox*, sendo possivelmente induzida pelas enzimas fosfolipases  $\text{A}_2$ .

## 6.2 Efeitos *in vitro*

O endotélio e o músculo liso vascular representam alvos importantes para a atuação de peçonhas, mostrando que essas exercem efeitos adversos sobre essas células, especialmente as endoteliais, levando a liberação de mediadores endógenos (vasodilatadores, vasoconstritores, moléculas pró inflamatórias, etc.).

(Lomonte et al., 1994a, b; Borkow et al., 1995; Lomonte et al., 1999; Kawano et al., 2002; Cominetti et al., 2004).

Considerando o exposto acima, para uma melhor caracterização da atividade hipotensora do BIV observada *in vivo*, foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar a participação da vasculatura e do músculo cardíaco nos efeitos cardiovasculares observados. Estes ensaios excluem a interferência de outros sistemas fisiológicos sobre estas respostas.

Em um ensaio preliminar, os efeitos da BIV foram avaliados em corações isolados de ratos Wistar utilizando o método de Langendorff (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Germany), de acordo com o descrito por Doring, 1990.

Doses (10-100 $\mu$ g) da peçonha de *B.leucurus*, diretamente no músculo cardíaco não provocaram efeitos significativos na frequência cardíaca, na força de contração e na pressão de perfusão no coração isolado. Esses resultados indicam que, a BIV não produz efeitos cardiotoxicos diretos no músculo cardíaco nas doses testadas (dados não mostrados). Mesmo se tratando de dados preliminares que necessitam ser confirmados, resultados semelhantes foram encontrados para a peçonha da serpente australiana *Oxyuranus scutellatus* (Chaikasul et al, 2012).

Sifuentes e colaboradores (2008), entretanto, mostraram que a peçonha de *B. jararacuçu* administrada em infusão contínua (10  $\mu$ g/mL) em ratos, provoca uma redução progressiva na força de contração ventricular e no tamanho da onda de tensão com aumento de liberação de creatino quinase (CK) no meio, sugerindo uma ação miotóxica direta de algum componente da peçonha sobre o músculo cardíaco. A divergência entre os dados do presente trabalho e os descritos por Sifuentes et al., (2008), pode estar relacionada com a diferente forma de administração da peçonha, dose única *versus* infusão contínua respectivamente.

Após a sugestão que a BIV não induz efeitos cardiotoxicos diretos sobre o coração isolado, foi investigada sua ação sobre a vasculatura usando anéis isolados de artérias mesentéricas.

Nestes vasos pré-contraídos com Phe (usando doses de 1-20  $\mu\text{g/mL}$ ) BIV induziu uma resposta vasodilatadora dose dependente, provocando um relaxamento vascular de  $90 \pm 6 \%$  na dose máxima utilizada.

Essa resposta parece ser mediada tanto pelo endotélio quanto pelo músculo liso vascular, pois mesmo após remoção mecânica do endotélio vascular, a peçonha (10  $\mu\text{g/mL}$ ) ainda foi capaz de induzir ( $45,1 \pm 7,7\%$  de relaxamento), quando comparado à resposta em anéis de mesentérica com endotélio intacto ( $81,6 \pm 5,6\%$ ).

Respostas similares já foram documentas em estudos com o veneno de outras serpentes. Chaisalul e colaboradores (2012) demonstraram que a peçonha de *O. scutellatus* possui efeitos vaso relaxadores dependentes e independentes do endotélio vascular. Estes autores ainda mostraram que essa peçonha não tem toxicidade direta nas células endoteliais vasculares, uma vez que a integridade endotelial foi demonstrada pela manutenção do efeito relaxante induzida pela acetilcolina após a ação da peçonha.

De forma semelhante aos ensaios cardiovasculares *in vivo*, utilizamos estratégias farmacológicas com o intuito de elucidar os mecanismos envolvidos no efeito vasodilatador induzido pela BIV. Primeiramente avaliamos se as proteases comumente encontradas em peçonhas botrópicas estavam associadas com a resposta vasodilatadora induzida pela BIV.

Proteases são enzimas que apresentam grande interesse farmacológico e clínico estando envolvidas com vários processos fisiológicos. Estão relacionados com a liberação de mediadores endógenos inflamatórios e também na indução do aumento da permeabilidade vascular local e sistêmico, podendo induzir alterações cardiovasculares (Gutiérrez et al, 2009).

Para isto inibidores para metaloproteases (EDTA) e serinoproteases (PMSF), em concentrações efetivas, foram pré-incubados com a BIV e posteriormente administradas nos vasos isolados. Estes inibidores não foram capazes de alterar a resposta vascular induzida pela BIV, sugerindo que estas atividades proteolíticas - inerentes da peçonha - não contribuem para os efeitos vasculares observados.

Adicionalmente, foi verificada também a participação dos prostanóides e do óxido nítrico na vasodilatação observada. De forma semelhante ao observado nos

experimentos *in vivo*, o pré-tratamento dos vasos com o L-NAME, 30 minutos antes da administração da peçonha, também não alterou a resposta induzida pela peçonha, demonstrando que o óxido nítrico não contribui para a vasodilatação induzida pela BIV. Já o pré-tratamento com indometacina, foi capaz de bloquear em ~35% a vasodilatação induzida por BIV, mostrando que assim como na resposta hipotensora, a via dos prostanóides também está relacionada com a vasodilatação induzida pela BIV.

O envolvimento desta via na vasodilatação induzida por peçonhas de serpentes tem sido demonstrado por vários autores. Chaisakul e colaboradores (2012), investigando mais profundamente essa via no efeito vasodilatador, mostraram que o bloqueio da PKA usando o inibidor competitivo Rp-8-CPT-cAMPs, aboliu o componente sensível a indometacina do relaxamento induzido pela peçonha de *Oxyuranus scutellatus*. Esse relaxamento também foi significativamente reduzido utilizando Iberiotoxina (IbTx), um bloqueador seletivo de canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de grande condutância. Outro estudo também demonstrou que injeções de PGI<sub>2</sub> “*in vivo*” causaram rápida depleção de AMPc em neurônios de ratos (Shimid et al, 1987), sugerindo que esse pode ser um dos mediadores endógenos depletados após adições subsequentes de peçonha.

O efeito hipotensor da peçonha observado *in vivo* se correlaciona com o efeito vaso relaxador observado *in vitro*, sendo que o bloqueio parcial de ambos pela indometacina, indica que além dos prostanóides outros componentes da peçonha - em adição a já sugerida ação da PLA2 - estão envolvidos nestas respostas cardiovasculares, que podem atuar de forma sinérgica. Esses efeitos podem estar relacionados com os peptídeos potencializadores de bradicinina comum em peçonhas animais (para revisão ver Horta et al., 2016). Estes, como já descrito na introdução, podem atuar inibindo a enzima ECA, evitando a formação do vasoconstritor angiotensina II e também a degradação do vasodilatador bradicinina, potencializando a hipotensão induzida pelo envenenamento (Camargo et al, 2012).

Apesar da inibição por PMSF não alterar a resposta vascular induzida pela BIV, a via de liberação de bradicinina pela enzima caliceína-*like* (serinoprotease) pode também estar envolvida nas respostas cardiovasculares induzidos por BIV, considerando que o inibidor utilizado é inespecífico.

Em resumo, nossos resultados *in vivo* e *in vitro*, sugerem que os efeitos induzidos pela peçonha de *Bothrops leucurus* parecem ser mediados principalmente pela vasculatura e não pelo tecido cardíaco, e envolvem a via dos metabólitos do ácido araquidônico.

### 6.3 Soroterapia

Mesmo considerando a pouca capacidade em neutralizar os efeitos tóxicos induzidos por componentes pouco imunogênicos da peçonha (Moura da Silva, 1990), os efeitos locais devido a demora do início do tratamento (Chaves et al, 1995) e os mecanismos inflamatórios indiretos (Farsky et al, 1997), a soroterapia continua sendo o único tratamento efetivo após envenenamentos ofídicos.

No Brasil o soro, utilizado como terapia para os acidentes botrópicos, é produzido por dois órgãos públicos: Instituto Butantan (São Paulo, SP) e pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED - Belo Horizonte, MG). Estes são pentavalentes produzidos com uma mistura de cinco peçonhas das espécies: *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacuçu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, considerando a epidemiologia de envenenamentos (Ministério da Saúde, 1996).

Nesse trabalho, a eficácia do soro antibotrópico – FUNED - em neutralizar as alterações cardiovasculares imediatas causadas pela BIV foi acessada, *in vivo* e *in vitro*.

Nos experimentos *in vivo*, utilizando a dose recomendada pela instituição fabricante, o soro antibotrópico teve alta eficácia sendo capaz de neutralizar quase completamente a hipotensão induzida pela peçonha. Várias proporções BIV/soro foram avaliadas *in vitro*, mostrando uma relação dose soro dependente na neutralização do efeito vasodilatador. Foi necessária uma dose quatro vezes maior do que a estipulada para neutralização total do efeito vascular.

Estes dados demonstram pela primeira vez a efetividade do soro antibotrópico (FUNED), em neutralizar os componentes da BIV com atividade cardiovascular, mesmo esta peçonha não fazendo parte da mistura utilizado para desafio dos

animais produtores. Isto pode ser justificado por reatividades cruzadas entre venenos do mesmo gênero, (Estevao-Costa et al, 2016).

Tem-se demonstrado que reatividades cruzadas – imunogenicidade – são uteis para estudo comparativo da composição de peçonhas (Pla et al., 2012); e ainda fornece a base para o uso clínico desses antivenenos no tratamento de acidentes por espécies epidemiologicamente importantes, que não participam do “pool” de peçonhas utilizadas para a produção do soro (p ex. *B. atrox* na região amazônica, *B. leucurus* na região nordeste e sudeste do Brasil) (Camey et al., 2002; Pardal et al., 2004; França e Málaque, 2009).

#### **6.4 Isolamento e caracterização do componente – toxina – responsável pelos efeitos cardiovasculares da peçonha de *B. leucurus*.**

Diversos componentes com atuação sobre o sistema cardiovascular já foram isolados a partir de peçonhas de serpentes. Um análogo ao ativador de plasminogênio, de *Pseudonaja textilis* (Chaisakul et al, 2015), uma serinoprotease (Thrombin-like) com atividade anticoagulante de *Bothrops moojeni* (Moraes et al, 2012), uma metaloprotease que atua como agente trombolítico de *Agkistrodon contorix* (Ahmed et al, 1990) e também uma fosfolipase A2 de *Oxyuranus scutellatus* (Chaisakul et al, 2014). Como já descrito, ainda não existem estudos sobre os efeitos cardiovasculares provocados pela peçonha de *Bothrops leucurus*.

Para realização de estudos de atividades biológicas de uma molécula, e definição de seu mecanismo de ação, faz-se necessário o isolamento desta. No caso de toxinas de peçonhas, este isolamento poderá ainda conduzir a terapias específicas.

Neste trabalho, um componente associado com as alterações cardiovasculares imediatas induzidas pela peçonha de *B. leucurus*, foi identificado após o seu isolamento.

O processo de purificação envolveu duas etapas cromatográficas: cromatografia de troca iônica - em etapas isocráticas - e cromatografia de fase reversa realizadas em sistema de alta resolução (HPLC).

Na primeira etapa a peçonha bruta foi fracionada em oito picos principais, sendo que a atividade vasodilatadora foi associada principalmente a fração 5, eluída ao final da segunda etapa isocrática (15% do gradiente de NaCl). Essa fração apresentou duas bandas proteicas principais em SDS-PAGE, com migração relativa de 20 kDa e 15 kDa. Estes dois componentes foram posteriormente resolvidos por cromatografia de fase reversa e denominados BI-5-I e BI-5-II.

A análise por espectrometria de massa destas frações mostrou que cada uma possuía um único componente, de massa molecular de 13889,975 Da para BI-5-I e 23003,143 Da para a fração BI-5-II. Esta análise também demonstrou que as proteínas obtidas apresentam alto grau de homogeneidade e que o processo de purificação estabelecido neste trabalho, foi efetivo em isolar estas duas proteínas.

Após garantia da homogeneidade das amostras, estas foram submetidas à fragmentação pela técnica de MALDI-MS, que permitiu identificar sequências de 26 e 36 resíduos de aminoácidos para as proteínas BI-5-I e BI-5-II respectivamente.

A sequência de aminoácidos identificada na amostra F V-1, apresentou alta similaridade com fosfolipases A2 de peçonhas botrópicas, apresentando 100% de homologia com uma fosfolipase A2 (bID-PLA<sub>2</sub>) de *Bothrops leucurus* (Higuchi et al, 2006), 100% com uma fosfolipase A2 de *Bothrops jararacussu* (Pereira et al, 1998) e 92% com uma fosfolipase A2 de *Bothrops asper* (Kaiser et al, 1990). Além disso, a massa molecular identificada na F V-1, por MALDI-ToF (13889,975 Da), foi similar (igual) a PLA<sub>2</sub> já purificada de *Bothrops leucurus* (Higuchi, 2006) e de outras PLA<sub>2</sub> isoladas de peçonhas de serpente, como *Bothrops alternatus*, *Bothrops marajoensis*, entre outras (Ponce-Soto et al., 2007, 2010; Perumal et al., 2008; Garcia et al., 2010).

A sequência identificada na F V-2, apresentou alta similaridade com metaloproteases de peçonhas já descritas: 97% de homologia com a metaloprotease P-I (leucurolisina-a) de *Bothrops leucurus* (Bello et al, 2006) e 92% de homologia com a metaloprotease P-I (BmoMPalfa-I) de *Bothrops moojeni* (Bernardes et al, 2008). A massa molecular identificada por MALDI-ToF (23003,143 Da) foi similar a de leucurolisina-a de *Bothrops leucurus* e de diversas outras metaloproteases P-I de peçonhas, como *Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti*, entre outras. (Sanchez et al, 1991; 2010; 2016).

Em resumo, os dados das análises de massas e os provenientes da busca em bancos de dados nos permitiu mostrar: (i) a sequência de 27 resíduos identificada na amostra BI-5-I apresenta 22% de cobertura com 100% de identidade com a toxina bID-PLA<sub>2</sub> - uma fosfolipase A<sub>2</sub> básica da peçonha de *B. leucurus*; (ii) a sequência de 30 resíduos identificada na amostra BI-5-II apresenta 15% de cobertura com 97% de identidade com a toxina leucurolisina-a - uma metaloprotease P-I de veneno de serpente (SVMP) da peçonha de *B. leucurus*; (iii) massas identificadas (MALDI – ToF) nas amostras BI-5-I (13.889,975 Da) e BI-5-II (23.003,143 Da) (MALDI – ToF) correspondem a da bID-PLA<sub>2</sub> e da leucurolisina-a da peçonha de *B. leucurus*; (iv) As sequências apresentaram uma alta identidade sequencial com proteínas similares presentes em outras peçonhas botrópicas.

Os dados das análises de espectrometria de massa nos permitem inferir que a proteína da amostra F V-1 é a PLA<sub>2</sub> (bID-PLA<sub>2</sub>) e da F V-2 é a SVMP (leucurolisina-a), toxinas já descritas/purificadas a partir da peçonha de *Bothrops leucurus*.

Para verificar a atividade cardiovascular das toxinas purificadas (bID-PLA<sub>2</sub> e leucurolisina-a), o efeito na reatividade vascular foi avaliado em anéis pré-contraídos de artéria mesentérica, usando a dose de 1ug/mL. Nesta dose somente bID-PLA<sub>2</sub> foi capaz de induzir relaxamento nestes vasos.

Considerando que as condições da ultima etapa de purificação - fase reversa - podem acarretar desnaturação proteica devido a acidez e polaridade dos eluentes, avaliou-se a atividade vascular destas enzimas em amostras cedidas pelo Laboratório de Bioquímica de Venenos Animais da Fundação Ezequiel Dias, as quais foram purificadas com condições mais amenas de acordo com metodologias estabelecidas por Bello et al (2006) e Higuchi et al, (2006).

Os resultados confirmaram que somente a bID-PLA<sub>2</sub> é capaz de induzir relaxamento nos vasos e que a leucurolisina-a, na dose testada, não tem efeito sobre a reatividade vascular.

Estes dados estão em acordo com os resultados dos ensaios de inibição dos efeitos cardiovasculares induzidos BIV *in vivo* e *in vitro*, que demonstram que a

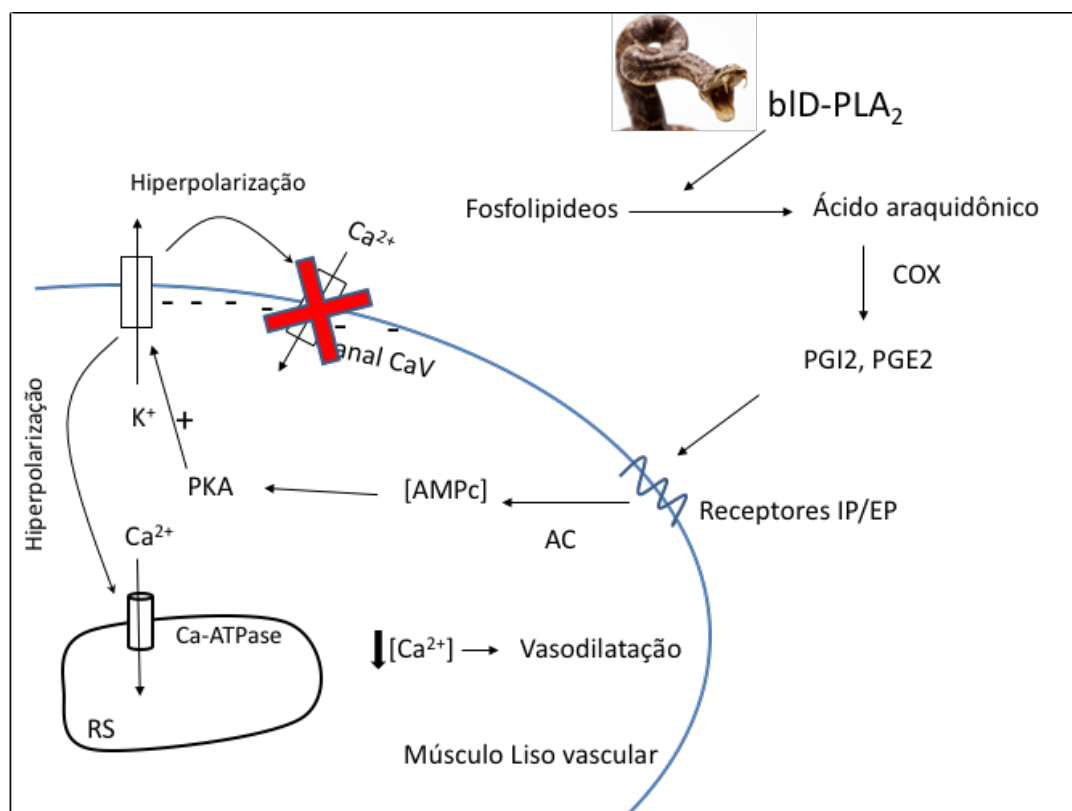


vasodilatação produzida pela peçonha é parcialmente revertida pela indometacina e não pela incubação da peçonha com o inibidor de metaloproteases EDTA.

Ainda a manutenção da atividade da bID-PLA<sub>2</sub>, depois da cromatografia de fase reversa demonstra que esta enzima apresenta alta estabilidade. Característica esta, já descrita por Rueda, 2009, que mostrou que as PLA<sub>2</sub>, mantem sua atividade mesmo quando submetida a diferentes temperaturas e valores de pH, devido principalmente a manutenção de sua conformação nativa pelo grande número de pontes dissulfeto intracadeia.

Apesar da bID-PLA<sub>2</sub> já ter sido isolada da peçonha de *B. leucurus* (Higuchi et al, 2006), e que o vaso relaxamento e a hipotensão induzido pelas peçonhas de *Daboia russelli* (Huang, 1984) e *Oxyuranus scutellatus* (Chaikasul, 2012) também já foram descritos, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos nessas alterações após o envenenamento ofídico. No presente trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que a peçonha da *B. leucurus* induz vaso relaxamento e consequentemente hipotensão imediatamente após o envenenamento, os quais envolvem a participação da fosfolipase bID-PLA<sub>2</sub>.

Considerando nossos dados e a literatura, pode-se inferir que pelo menos parte dos efeitos cardiovasculares induzidos pela BIV são produzidos pelo aumento da liberação de prostanóides vasodilatadores pela via clássica dos metabólitos do ácido araquidônico, que se inicia pela atividade esterásica da fosfolipase da BIV, conforme mostrado a seguir (Fig. 26).



**Figura 26: Resposta vasodilatadora induzida pela bID-PLA<sub>2</sub>.** A fosfolipase (bID-PLA<sub>2</sub>) purificada a partir da peçonha de *B. leucurus*, é capaz de gerar prostanoídeos, os quais ativam mensageiros intracelulares culminando em vasodilatação.

Imediatamente após o envenenamento a bID-PLA<sub>2</sub>, presente na peçonha de *B. leucurus*, atua sobre os fosfolípidos de membrana liberando o ácido araquidônico. Após sua liberação esse ácido graxo sofre uma ciclicização oxidativa catalisada pela enzima bifuncional COX, primeiramente pela atividade da ciclooxigenase da COX formando PGG<sub>2</sub> a qual será transformada em PGH<sub>2</sub> pela atividade da peroxidase da COX. PGH<sub>2</sub> serve como substrato para formação das prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), por ação de suas sintases específicas – prostaglandina E<sub>2</sub> sintase e prostaglandina I<sub>2</sub> sintase.

Esses prostanoídeos ligam-se aos receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> (PGE<sub>2</sub>) e IP (PGI<sub>2</sub>), acoplados a proteína G, ativando a adenilil ciclase acarretando aumento [AMPc] que por sua vez ativa alostericamente proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA). A PKA fosforila e acentua o processo de ativação dos canais de K<sup>+</sup> específicos na membrana plasmática do músculo liso vascular, induzindo hiperpolarização da

célula, que por sua vez reduz a probabilidade de abertura de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente, além de ativar bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana da célula e aumentar a receptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo. Esses eventos induzem uma diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracelular, provocam o relaxamento vascular e consequentemente a resposta hipotensora observada no envenenamento.

Entretanto, através das análises de todos os resultados obtidos nesse trabalho, percebe-se que estudos adicionais devem ser realizados na tentativa de identificar outros componentes, ou outras vias, envolvidas na resposta cardiovascular imediata induzida por esta peçonha.

# ***Considerações finais***

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho gerou conhecimentos sobre a peçonha da serpente *Bothrops leucurus*, que excedem as investigações prévias descritas na literatura. Contribuiu para o entendimento da resposta cardiovascular aguda induzida por essa peçonha, o qual poderá conduzir a novas estratégias terapêuticas complementares à soroterapia já utilizada.

- ✓ Nossos resultados demonstraram pela primeira vez, que a peçonha bruta da serpente *Bothrops leucurus* (BIV) induz hipotensão imediata em ratos anestesiados, e este efeito está relacionado a uma vasodilatação sistêmica. Pelo menos parte destes efeitos podem ser associados com a liberação de prostanóides vasodilatadores.
- ✓ O soro antibotrópico “comercial” é capaz de neutralizar os efeitos cardiovasculares induzidos pela BIV, mesmo essa não fazendo parte do “pool” de peçonhas utilizados na sua produção, sugerindo que todo o efeito cardiovascular é causado por moléculas proteicas.
- ✓ Um componente - toxina - associado com as alterações cardiovasculares imediatas induzidas pela BIV, foi isolado, sendo que o processo de purificação estabelecido foi otimizado e consistiu de somente duas etapas cromatográficas (troca iônica e fase reversa).
- ✓ A caracterização química da toxina isolada, por análises de espectrometria de massa (MALDI-ToF e MALDI-MS), mostraram massa molecular de 13.889,975 Da e identificaram uma sequência interna de 27 resíduos de aminoácidos. Estes dados mostraram que a toxina purificada é a fosfolipase bID-PLA2.
- ✓ Em conclusão pode-se inferir que pelo menos parte dos efeitos cardiovasculares imediatos da BIV são produzidos pelo aumento da liberação de prostanóides vasodilatadores pela via clássica dos metabólitos do ácido araquidônico, que se inicia pela atividade esterásica da fosfolipase bID-PLA2 intrínseca desta peçonha.

# ***Referências***

## 8 REFERÊNCIAS

Abdalla S, Bilito Y, Disi A. Effects of sand viper (*Cerastes cerastes*) venom on isolated smooth muscle and heart and on haematological and cardiovascular parameters in the guinea-pig. **Toxicon**. 30: 1247-1255, 1992.

Adams Z.S, Gattullo D, Losano G, Marsh NA, Vacca G, Whaler BC. The effect of *Bitis gabonica* (gaboon viper) snake venom on blood pressure, stroke volume and coronary circulation in the dog. **Toxicon**. 19: 263-270, 1981.

Adams, ME, Bindokas, VP, Hasegawa, L, Venema, VJ. Omegaagatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. **J. Biol. Chem**. 265: 861-867, 1990.

Aird SD. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**. 40: 335-393, 2002.

al-Shammary FJ, al-Saleh SS, el-Shewemi SE. Ultrastructural variations of rat myocardium due to *Walterinnesia aegyptia* snake envenomation. **J Electron Microsc (Tokyo)**. 47: 637-643, 1998.

Andrade ALF. Estudo farmacológico da peçonha de *Bothrops moojeni*. **Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**, Campinas, 1996.

Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Mancin AC, Reis ML, Ballejo G, Giglio JR. Isolation and characterization of an arginine ester hydrolase from *Bothrops jararacussu* venom which induces contractions of the isolated rat uterus. **Biochem Mol Biol Int**. 47: 699-706, 1999.

Barrett AM. The effects of some autonomic blocking agents on the heart rates of anaesthetized and pithed rats. **European Journal of Pharmacology**. 15: 267–273, 1971.

Bello, CA, Hermogenes AL, Magalhaes A, Veiga SS, Gremski SH, Richardson M, Sanchez EF. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**. 88: 189–200, 2006.

Bernardes CP, Santos-Filho NA, Costa TR, Gomes MS, Torres FS, Costa J, Borges MH, Richardson M, dos Santos DM, de Castro Pimenta AM, Homsí Brandeburgo MI, Soares AM, de Oliveira F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. 51 (4): 574–584, 2008.

Bernardoni JL, Sousa LF, Wermelinger LS, Lopes AS, Prezoto BC, Serrano SMT, et al. Functional Variability of Snake Venom Metalloproteinases: Adaptive Advantages in Targeting Different Prey and Implications for Human Envenomation. **Plos ONE**. 9 (10), 2014.

Borkow G, Gutiérrez JM, Ovadia M. In vitro activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. **Toxicon**. 33: 1387–1391, 1995.

Brenner BM, Troy JL, Ballermann BJ. Endothelium-dependent vascular responses, mediators and mechanisms. **J Clin Invest**. 84: 1373–1378, 1989.



Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS letters**. 583:1736–174, 2009.

Calvete JJ. Snake venomics: From the inventory of toxins to biology. **Toxicon**. 75: 44-62, 2013.

Camargo AC, Ianser D, Guerreiro JR, Serrano SM. Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril. **Toxicon**. 59 (4): 516-524, 2012.

Cardoso JLC, França OSF, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V (orgs). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 6-12, 2003.

Cardoso KC, da Silva MJ, Costa GGL, Torres TT, Del Bem LEV, Vidal R, Menossi M, Hyslop S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**. 11:605, 2010.

Carlson RW, Schaeffer Jr. RC, Whigham H, Michaels S, Russell FE, Weil MH. Rattlesnake venom shock in the rat: development of a method. **Am J Physiol**. 229: 1668-1674, 1975.

Cevese A, Gattullo D, Losano G, Marsh NA, Vacca G, Whaler BC. The effect of *Bitis gabonica* (gaboon viper) snake venom on external iliac and mesenteric arterial circulation in the dog. **Toxicon**. 21: 67-74, 1983.

Chaisakul J, Isbister GK, Konstantakopoulos N, Tare M, Parkinson HC, Hodgson WC. In vivo and in vitro cardiovascular effects of Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus*) venom: Exploring “sudden collapse”. **Toxicology Letters**. 213: 243-48, 2012.

Chaisakul J, Isbister GK, Kuruppu S, Konstantakopoulos N, Hodgson WC. An examination of cardiovascular collapse induced by eastern brown snake (*Pseudonaja textilis*) venom. **Toxicology Letters**. 221: 205-211, 2013.

Chaisakul J, Isbister GK, O'Leary MA, Parkington HC, Smith AI, Hodgson WC, Kuruppu. Prothrombin activator-like toxin appears to mediate cardiovascular collapse following envenoming by *Pseudonaja textilis*. **Toxicon**. 102: 49-54, 2015.

Chaisakul J, Isbister GK, Tare M, Parkington HC, Hodgson WC. Hypotensive and vascular relaxant effects of phospholipase A<sub>2</sub> toxins from Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus*) venom. **European Journal of Pharmacology**. 723: 227-233, 2014.

Chaves F, Barboza M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**. 33: 31-39, 1995.

Cidade DAP, Simão TA, Dávila AMR, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo ILM, Ho PL, Bon C, Zingali RB, Albano RM. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: **Analysis of the gene expression pattern**. 48 (4): *Toxicon*. 437-461, 2006.

Cominetti MR, Terrugi CH, Ramos OH, Fox JW, Mariano-Oliveira A, de Freitas MS, Figueiredo CC, Morandi V, Selistre-de-Araújo HS. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J Biol Chem**. 279: 18247-18255, 2004.

Crachi MT, Hammer LW, Hodgson WC. A pharmacological examination of venom from the Papuan taipan: (*Oxyuranus scutellatus canni*). **Toxicon**. 37: 1721-1734, 1999.

Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem. Rev.** 111: 6130-6185, 2011.

Dias L, Rodrigues MA, Rennó AL, Stroka A, Inoue BR, Panunto PC, Melgarejo AR, Hyslop S. Hemodynamic responses to **Lachesis muta** (South American bushmaster) snake venom in anesthetized rats. **Toxicon**. 123: 1-14, 2016.

Dias L, Rodrigues MAP, Smaal A, Rennó AL, Mello SM, Moreno Jr H, Hyslop S. Cardiovascular responses to *Bothrops alternatus* (urutu) snake venom in anesthetized dogs. **Cardiovasc Toxicol**. 12: 243-257, 2012.

Doring HJ. The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function-application. **Physiol Bohemoslov**. 39(6):481-504, 1990.

Estevao-Costa, MI, Gontijo SS, Correia, BL, Yarleque A, Vivas-Ruiz D, Rodrigues E, Chávez-Orlategui C, Oliveira LS, Snchez EF. Neutralization of toxicological activities of medically-relevant *Bothrops* snake venoms and relevant toxins by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil. **Toxicon**. 122: 67-77, 2016.

Evangelista IL. Caracterização das atividades cardiorenal e neural de *Bothrops marajoensis* e suas frações. **Tese de doutorado, Universidade Federal do Ceará**, 2009.

Farsky SHP, Walber J, Costa-Cruz M, Cury Y, Teixeira CF. Leukocyte response induced by Bothrops jararaca crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon**. 35: 185-193, 1997.

Felicori LF, Souza CT, Velarde DT, Magalhães A, Almeida AP, Figueiredo S, Richardson M, Diniz CR, Sanchez EF. **Kallikrein-like proteinases from bushmaster snake venom. Protein Exp. Purif.** 30: 32-42, 2003.

Fenwick, AM, Guberlirt, JR, Evans, JA, Parkinson, CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South America pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis and Bothrocophias (serpentes:Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**,156: 617-640, 2009.

Ferreira SH, Barteld DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. **Biochemistry**. 9: 2583–2593, 1970.

Ferreira SH, Rocha e Silva M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating fator) from Bothrops jararaca venom. **Experientia**. 21(6): 347-349, 1965.

Ferreira, SH. A bradykinin-potentiating (BPF), presente in the venom of Bothrops jararaca. Br. **J. Pharmacol. Chemoter**. 24: 263-169, 1965.

Figueiredo, SG. Tx4(6-1): Toxina com atividade inseticida da peçonha da aranha Phoneutria nigriventer. Purificação e caracterização química. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 1995.

Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.** 275 (12): 3016-30, 2008.

Fox, JW, Serrano, SM. Structural consideration of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon.** 45 (8): 969-985, 2005.

França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V (Eds.), **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** Sarvier/FAPESP, São Paulo. 72-86, 2003.

Fry, BG, Vidal N, van der Weerd L, Kochova E, Renjifo C. Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. **Journal of Proteomics.** 62 (2): 127-136, 2009.

FUNASA, 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Fundação nacional da saúde**, 2001.

Furtado MF, Cardoso ST, Soares OE, Pereira AP, Fernandes DS, Tam DV, Sant'Ana OA. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of Bothrops venoms from snakes of the Amazon region. **Toxicon.** 55: 881-887, 2010.

Gapanhuk E, Hneriques OB. Kinins released from horse heat-acid-denatured plasma by plasmin, plasma kallikrein, trypsin and Bothrops kininogenase. **Biochem. Pharmacol.** 19: 2091-2096, 1970.

Garcia-Denegri ME, Acosta OC, Huancahuire-Vega S, Martins-de-Souza D, Marangoni S, Maruñak SL, Teibler GP, Leiva LC, and Ponce-Soto LA. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 Ba SpII RP4 of the Bothrops alternatus snake venom from Argentina. **Toxicon.** 56: 64-74, 2010.

Glenn, JL. and Straight, R. Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venom: variation in toxicity with geographic origin. **Toxicon.** 16: 81–84, 1978.

Global Skanebite Initiative. Disponível em: <[http://snakebiteinitiative.org/? Pageid=657](http://snakebiteinitiative.org/?Pageid=657)>. Acesso em:18.jan.2018.

Glusa E, Brauns H, Stocker K. Endothelium-dependent relaxant effect of thrombocytin, a serine proteinase from *Bothrops atrox* snake venom, on isolated pig coronary arteries. **Toxicon.** 29(6): 725-732, 1991.

Gomes A, De P, Dasgupta SC. Occurrence of a unique protein toxin from the Indian king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Toxicon.** 39: 363-370, 2001.

Granados-Zuniga J, Aragón-Ortiz F. Cardiovascular alterations induced by the venom of *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) and its fibrinogenolytic enzyme. **Rev Biol Trop.** 46: 1149-1157, 1998.

Gremski LH, Chaim OM, Paludo KS, Sade YB, Otuki MF, Richardson M, Gremski W, Sanchez EF, Veiga SS. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from Bothrops leucurus snake venom. **Toxicon**. 50: 120-134, 2007.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**. 62: 27-39, 2013.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Diaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**. 45: 997-1011, 2005.

Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**. 82: 841-850, 2000.

Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 82: 841-850, 2000.

Gutiérrez JM; Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bothrops asper snake venom. **Toxicon**. 54: 976–987, 2009.

Hatano Y, Nakamura K, Moriyama S, Mori K, Toda N. The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. **Anesthesiology** 71(1): 80-86, 1989.

Hawgood BJ. Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: **Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment**. (Tu AT, ed.). 121-162. Marcel Dekker, New York, 1982.

Hayashi MA, Camargo AC. The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**. 45: 1163–1170, 2005.

Higuchi DA, Barbosa CM, Bincoletto C, Chagas JR, Magalhaes A, Richardson M, Sanchez EF, Pesquero JB, Araujo RC, Pesquero JL. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Toxicon**. 89: 319-328, 2006.

Horta, CCR, Chatzaki M, Rezende BA, Magalhães BM, Duarte, CG, Felicori LF, Oliveira-Mendes BBR, Carmo AA, Chávez-Olortegui C, Kalapothakis E. **Curr Med Chem**. 23(6): 603-622, 2016.

Huang HC. Effects of phospholipases A2 from *Vipera russelli* snake venom on blood pressure, plasma prostacyclin level and renin activity in rats. **Toxicon**. 22: 253–264, 1984.

Hyslop S, Marsh NA. Compariosn of the physiological effects in rabbits of gaboon viper (*Bitis gabonica*) venoms from diferente sources. **Toxicon**. 29(10): 1235-1250, 1991.

Isbister GK, Scorgie FE, O'Leary MA, Seldon M, Brown SG, Lincz LF. Factor deficiencies in venom-induced consumption coagulopathy resulting from Australian



elapid envenomation: Australian Snakebite Project (ASP-10). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 8: 2504–2513, 2010.

Junqueira-de-Azevedo I, Ho PL. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pit viper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**. 299: 279–291, 2002.

Kaiser II, Gutierrez JM, Plummer D, Aird SD, Odell GV. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys**. 278(2): 319-325, 1990.

Kamiguti AS, Sano-Martins I. South American snake venoms affecting haemostasis. **J Toxinol – Toxin Rev**. 14: 359-374, 1995.

Kawano J, Anai K, Sugiki M, Yoshida E, Maruyama M. Vascular endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom: no-significance of hemorrhagic metalloproteinase. **Toxicon**. 40: 1553-1562, 2002.

King GF. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**. 11(11): 1469-1484, 2011.

Kinjo N, Noguchi K, Hirayama K, Sakanashi M. Characteristics of cardiovascular effects of the venom of habu (*Trimeresurus flavoviridis*) in rats. **Jpn J Pharmacol**. 54: 151-161, 1990.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227: 680–685, 1970.

Lee CY, Lee SY. Cardiovascular effects of snake venoms. In: **Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology**, (Lee CY, ed.). 52: 547-590. Springer-Verlag, Berlin, 1979.

Lira-da-Silva RM, Misel YF, Casais-e-Silva LL, Ulloa J, Hamdan B, Brazil TK. Serpentes de importância médica no nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. 79: 7-20, 2009.

Lira-da-Silva RM. Estudo farmacológico do veneno de *Bothrops leucurus* (serpentes; viperidae). **Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas**, Campinas, SP, 2001.

Lomonte B, Angulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M, Daniele JJ, Geoghegan P, Gutiérrez JM. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon**. 37: 145-158, 1999.

Lomonte B, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A, Hanson LA. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. **Toxicon**. 32: 505-510, 1994a.

Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A2 of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**. 32: 1359-1369, 1994b.

Lowry OH, Rosenbrought MJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**.193: 265-275, 1951.

Magalhaes A, Magalhaes HP, Richardson M, Gontijo S, Ferreira RN, Almeida AP, Sanchez EF. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. *Comp BiochemPhysiolMol Integrative Physiol*. 146: 565–575, 2007.

Mebs, D. Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologists, toxinologists, physicians and pharmacists. **Medpharm Scientific Publ.**, Stuttgart, 2002.

Melgarejo, AR. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, LC et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier. 33-61, 2003.

Menezes,MC, Furtado, MF, Travaglia-cardoso, SR, Camargo ACM, Serrano, MTS. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**. 47: 304–312, 2010.

Menin L, Perchuæ A, Favreau P, Perret F, Michalet S, Schöni R, Wilmer M, Stöcklin R. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. **Toxicon**. 51 (7): 1288–1302, 2008.

Ministério da saúde, 2016. Informe epidemiológico Animais peçonhentos. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/20/In>

forme-Epidemiol--gico-animais-pe--onhentos---.pdf. Acesso em 15 de janeiro de 2017.

Moreno E, Gutiérrez JM. Body distribution of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin and its relationship to pathology. **Toxicon**. 26: 403–409, 1988.

Moura da Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM. Differences in Distribution of myotoxic proteins in venoms from different bothrops species. **Toxicon**. 28: 1293-1301, 1990.

Mulvany MJ, Halpern, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation research**. 41(1): 19-26, 1977.

Murayama N, Hayashi MAF, Ohi H, Ferreira LAF, Hermann VV, Saito H, Fujita Y, Higuchi S, Fernandes BL, Yamane T, de Camargo ACM. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94: 1189-1193, 1997.

Naumann GB, Silva LF, Silva L, Faria G, Richardson M, Evangelista K, Kohlhoff, M, Gontijo CMF, Navdaev A, Rezende FF, Eble JA, Sanchez EF. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochim. Biophys. Acta**. 1810: 683–694, 2011.

Neiva M, Arraes FBM, de Souza JV, Rádis-Baptista G, da Silva, IRBP, Walter, MEMT, Brigido MM, Yamane T, López-Lozano JL, Astolfi- Filho S. Transcriptome

analysis of the Amazon viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**. 53: 427-436, 2009.

Nunes ES, Souza MA, Vaz AF, Silva TG, Aguiar JS, Batista AM, Guerra MM, Guarnieri MC, Coelho LC, Correia MT. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**. 59: 667-671, 2012.

Ogay AY, Rzhnevsky DI, Murashev AN, Tsetlin VI, Utkin YN. Weak neurotoxin from *Naja kaouthia* cobra venom affects haemodynamic regulation by acting on acetylcholine receptors. **Toxicon**. 45: 93-99, 2005.

Olivo RA, Teixeira CFP, Wallace JL, Guitiérrez JM, Zamunér SR. Role of cyclooxygenase in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**. 49:670-677, 2007.

Parkington HC, Chow JA, Evans RG, Coleman HA, Tare M. Role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular tone in rat mesenteric and hindlimb circulations in vivo. **J Physiol**. 542: 929-937, 2002.

Pereira MF, Novello JC, Cintra AC, Giglio JR, Landucci ET, Oliveira B, Marangoni S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. **J. Protein Chem**. 17(4): 381-386, 1998.

Pérez AO, Koscinczuk P, Flinta SM, Maidana HR, Negrette MS. *Bothrops alternatus* envenoming in young dogs. **J. Venom. Anim. Toxins**. 3: 43-47, 1997.

Perumal SR, Gopalakrishnakone P, Ho, B, Chow VT. Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). **Biochimie**. 90: 1372-1388, 2008.

Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochimica Biophysica Acta**. 1770: 585-593, 2007.

Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. Neurotoxic, myotoxic and cytolytic activities of the new basic PLA2 Isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) snake venom. **The Protein Journal**. 29: 103-113, 2010.

Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FCV, Furtado MFD, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**. 52 (8): 842-851, 2008.

Rapoport, RM, Ashraf M, and Murad F. Effects of melittin on endothelium dependent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta. **Circ. Res**. 64: 463-473, 1989.

Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am J Physiol**. 156: 261-273, 1949.

Rodrigues MAP. Ação cardiovascular da peçonha de *Bothrops atrox* em ratos anestesiados. **Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**, 2016.

Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G, Gutierrez JM. Neutralization of four Peruvian Bothrops sp snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. **Acta tropica**. 93: 85-95, 2005.

Rosenberg P. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: **Natural Toxins. Animal, Plant and Microbial** (Harris JB, ed). 129-174. Clarendon Press: Oxford, 1986.

Rothschild AM, Rothschild Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. vol. 52. (Lee CY, ed.). 591-628, Springer Verlag, Berlin, 1979.

Rueda AQ. Caracterização funcional e estrutural de fosfolipases A2 isoladas da peçonha da serpente Bothrops asper do Panamá. **Tese de doutorado Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, SP, 2009.

Russel, FE. Toxic effects of animals toxins. In: Klassen, CD., (Ed.), **Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons**, McGraw-Hill, Sydney, 1996.

Russell FE, Buess FW, Strassberg J. Cardiovascular response to *Crotalus* venom. **Toxicon**. 1: 5-18, 1962.

Sanchez EF, Eble JA. P-III metalloproteinase (Leucurolysin-B) from Bothrops leucurus venom: isolation and possible inhibition in: C.T. Supuran, J.Y. Winum

(Eds.), **Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors**, 1st Edn., John Wiley & Sons, New Jersey. 789–812, 2009.

Sanchez EF, Magalhaes A, Mandelbaum FR, Diniz CR. **Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*).** *Biochim. biophys. Acta*. 1074: 347-356, 1991.

Sanchez EF, Richardson M, Gremski LH, Veiga SS, Yarleque A, Niland S, Lima, AM, Estevao-Costa, MI, Eble JA. A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettlysin-I from *Bothrops barnetti* (barnett's pitviper) snake venom with anti-platelet properties. **Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj**. 1860: 542-556, 2016.

Sanchez EF, Schneider FS, Yarleque A, Borges MH, Richardson M, Figueiredo S.G, Eble JA. A novel metalloproteinase atroxlysin-I from the Peruvian *Bothrops atrox* (jergon) snake venom acts both on ECM and platelets. **Arch. Biochim. Biophys**. 496: 9-20, 2010.

Sanchez, EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, Agostini-Cotta G, Diniz CR. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**. 30: 95-103, 1992.

Santos EP, Resende ES, Portella da Silveira PV, Fagundes DJ. Efeitos do soro antibotrópico nas alterações hemodinâmicas induzidas em cães pelo veneno de *Bothrops moojeni*. **Acta Cir Bras**.15, 2000.

Santos PEB, Souza L, Freire-Maia L, Almeida P. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. **Toxicon**. 28: 215-224,1990.



Sartim MA. Isolamento, caracterização bioquímica e funcional in vitro e in vivo de uma metaprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação. **Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, SP, 2014.

Schaeffer Jr. RC, Pattabhiraman TR, Carlson RW, Russell FE, Weil MH. Cardiovascular failure produced by a peptide from the venom of the southern Pacific rattlesnake, *Crotalus viridis helleri*. **Toxicon**.17: 447-453, 1979.

Schmid G, Bahner U, Palkovits M, Geiger H, Heidland A. Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) induces rapid depletion of cyclic AMP levels in brain nuclei of rats. **Life Sciences**. 41: 2547–2553, 1987.

Segura A, Castillo MC, Nunez V, Yarleque A, Goncalves LRC, Villalta M, Bonilla C, Herrera M, Vargas M, Fernandez M, Yano MY, Araújo HP, Boller MA, Leon P, Tintaya B, Sano-Martins IS, Gomez A, Fernandez P, Geoghegan P, Higashi HC, Leon C, Gutierrez JM. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**. 56(6): 980-989, 2010.

Serrano, SM. **The long road of research on snake venom serine proteinases**. **Toxicon**. 62: 19-26, 2013.

Sifuentes DN, El-Kik CZ, Ricardo HD, Tomaz MA, Strauch MA, Calil-Elias S, Arruda, EZ, Schwartz EF, Melo PA. Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**. 51(1): 38-36, 2008.

Soares MR, Oliveira-Carvalho AL, Wermelinger LS, Zingali RB, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo IL, Diniz MR. **Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from Lachesis muta venom.** *Toxicon*. 45: 803-806, 2005.

Srinivasa V, Sundaram MS, Anusha S, Hemshekhar M, Chandra Nayaka S, Kemparaju K, et al. Novel Apigenin Based Small Molecule that Targets Snake Venom Metalloproteases. **PLoS ONE**. 9(9), 2014.

Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolo G, Chaves F. Inflammation induced by Bothrops asper venom. **Toxicon**. 54:67-76, 2009.

Tibballs J, Sutherland SK, Kerr S. Studies on Australian snake venoms, Part I: the haemodynamic effects of brown snake (*Pseudonaja*) species in the dog. **Anaesth Intens Care**. 17: 466-469, 1989.

Tibballs J, Sutherland SK. The efficacy of heparin in the treatment of common brown snake (*Pseudonaja textilis*) envenomation. **Anaesthesia and Intensive Care**. 20: 33–37, 1992.

Vane RJ, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med**. 323: 27-36, 1990.

Vanhoutte, PM. Endothelium and control of vascular function. **Hypertension**. 13: 658-666, 1989.

Weinberg MLD, Felicori LF, Bello CA, Magalhães HPB, Almeida AP, Magalhães A, Sanchez EF. **Biochemical properties of a bushmaster snake venom serine proteinase (LV-Ka), and its kinin releasing activity evaluated in rat mesenteric arterial rings.** *J. Pharmacol. Sci.* 96: 333-342, 2004.

Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL, Serrano SM. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J. Proteome Res.* 9(5): 2278-2291, 2010.